



**Proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* para detecção de malária por nanoimunoensaios**  
**Isabel Silva**



**Isabel Bernardo Gonçalves Oliveira Silva**  
*Licenciada em Bioquímica*

**Proteínas recombinantes de  
*Plasmodium Falciparum* para deteção  
de malária por nanoimunoensaios**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa  
Co-orientador: Doutora Inês Gomes, Instituto de  
Medicina Molecular, Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira  
Arguente: Doutor Rui Miguel Prudêncio Cunha Pignatelli  
Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

**Isabel Bernardo Gonçalves Oliveira Silva**

*Licenciada em Bioquímica*

**Proteínas recombinantes de  
*Plasmodium Falciparum* para deteção  
de malária por nanoimunoensaios**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutora Inês Gomes, Instituto de  
Medicina Molecular, Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Arguente: Doutor Rui Miguel Prudêncio Cunha Pignatelli

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

# **Proteínas recombinantes de *Plasmodium Falciparum* para deteção de malária por nanoimunoensaios**

Indicação dos direitos de cópia em nome de Isabel Bernardo Gonçalves Oliveira Silva, aluna do Mestrado em Biotecnologia da FCT/UNL e da UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer ao Professor Ricardo Franco por mais uma vez me ter acolhido no seu laboratório e pelo tempo despendido ao longo de todo o trabalho.

Quero agradecer à Doutora Inês Gomes por toda a paciência, toda a dedicação e todo o tempo que dispensou para que este trabalho fosse possível.

Agradeço ao pessoal do 603 em geral, mas em especial à Inês Osório, ao João Luz, ao Tiago Monteiro e ao Carlos Salazar por todo o apoio e boa disposição.

Um agradecimento especial a todos meus amigos pela paciência e pelo apoio que me deram.

E por fim, mas não por último um agradecimento muito especial à minha família principalmente aos meus pais e aos meus irmãos, pois sem eles nada disto seria possível.

Obrigada a todos!



## Abstract

One of the goals of this work was the production and purification of three recombinant proteins from bacterial overexpression systems: OmpF (outer membrane protein F), a protein present in the membrane of *E. coli* cells that helps the diffusion of molecules inside the cells; Hsp70 (heat shock protein 70), a protein from chaperones family that induces fever and is isolated from *Plasmodium falciparum*, one of the parasites responsible for malaria infection; and HRPII (histidine rich protein II), a protein that is produced by *Plasmodium falciparum* during malaria infection. Hsp70 and HRPII will be used in immunoassays for detection of malaria infection.

The production and purification of OmpF was successful after the transformation of *E. coli* (DE3) BL21 Omp8 cells. The expression and purification of Hsp70 was optimized in some parameters in order to increase the efficiency of the process. It was possible to conclude that the pre-inoculum should be diluted 50 times and the time of incubation after the induction with IPTG should be around 16 hours. The protein HRPII showed several problems during the process of production and purification, but it was possible to determinate that a  $\mu\text{M}$  concentration of IPTG should be used for induction, and that growth temperature should be lowered from 37°C to 16°C in the moment of induction. The time of incubation after induction is a parameter that needs optimization. For the purification process, the concentration of imidazole in the washing and elution buffer still needs to be optimized.

In order to use bionanoconjugates constituted by gold nanoparticles with a MUA (mercaptoundecanoic acid) capping agent and conjugated with monoclonal anti-Hsp70 (2E6) and anti HRPII (2G12) antibodies, it is necessary to verify if they are stable in experimental conditions, such as ionic strength and pH and also for how long they can be stored before used. At this point just AuNP-MUA-2E6 were evaluated and these bionanoconjugates are stable in a range of pH from 2 to 12, and in a range of ionic strength from 0 to 2,5 M of NaCl. AuNP-MUA-2E6 bionanoconjugates are stable for 3 months stored at a temperature of 4°C.

The use of AuNP-MUA-2E6 bionanoconjugates was characterized in immunoassays of different formats: (i) ELISA assays in order to verify if the bionanoconjugates increased the assay sensitivity. Promising results are presented; (ii) Fluorimetric assays trying to get a calibration curve that allows the quantification of antigen Hsp70 in real samples. Results obtained are not satisfactory; (iii) Nitrocellulose test strips in a competitive assay, easy to interpret. The proof-of-principle of this assay was confirmed.

AuNP-MUA-anti-HRPII Bionanoconjugates were used in western-blot assays for detection of HRPII in various samples obtained along the process of production and purification of the HRPII antigen, and in infected and not infected cultures. Results were developed by chemiluminescence (indirect method) or using bionanoconjugates (direct) method. The chemiluminescence method revealed greater sensitivity than the direct method.

Keywords: malaria; HRPII; Hsp70; ELISA; fluorescence; RDT





## Resumo

Este trabalho teve como objetivo a produção e purificação de três proteínas recombinantes de sistemas de sobreexpressão bacterianos: a OmpF (*outer membrane protein F*), proteína presente na membrana de células de *E. coli* que auxilia a difusão de moléculas para o interior da célula; a Hsp70 (*heat shock protein 70*) proteína da família das chaperones produzida em estados febris, proveniente do *Plasmodium falciparum*, um dos parasitas responsáveis pela malária; e a HRPII (*histidine rich protein II*) proteína produzida pelo *Plasmodium falciparum* durante o seu ciclo de vida no hospedeiro. Também foi objetivo deste trabalho a utilização das proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* no desenvolvimento de imunoenaios para detecção de malária.

Os processos de produção e de purificação da proteína OmpF foram conseguidos com sucesso após a transformação de células de *E. coli* (DE3) BL21 Omp8. Os processos de expressão e de purificação da proteína Hsp70 foram otimizados em alguns parâmetros de forma a tentar aumentar a eficiência do processo. Conclui-se que o pré-inóculo deverá apresentar uma diluição de 1:50 e que o tempo de incubação após a indução com IPTG deverá ser de aproximadamente 16 horas. Quanto à proteína HRPII esta apresentou vários problemas durante os processos de produção e de purificação, mas foi possível determinar que durante o processo de produção se deve utilizar uma concentração de IPTG de 50  $\mu$ M, baixando a temperatura de 37°C para 16°C no momento da indução. O tempo de incubação após a indução é um parâmetro que ainda deve ser otimizado; durante o processo de purificação as concentrações de Imidazole nos tampões de lavagem e de eluição ainda necessitam de otimização futura.

De forma a utilizar bionanoconjugados constituídos por nanopartículas de ouro com o agente de revestimento MUA (ácido mercaptoundodecanóico) e conjugadas com anticorpos monoclonais anti-Hsp70 (2E6) em ensaios é necessário averiguar que estes são estáveis em diversas condições, nomeadamente à força iónica do meio assim como o valor de pH, e também quando tempo, estes poderão estar armazenados antes da sua utilização. Neste trabalho foi possível chegar à conclusão que os bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 são estáveis numa gama de pH entre 2 e 12, num intervalo força iónica entre 0 e 2,5 M de NaCl e são também estáveis durante 3 meses armazenados a uma temperatura de 4°C.

Pretendeu-se caracterizar a utilização dos bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) em imunoenaios em vários formatos: (i) ensaio de ELISA de forma a verificar se estes contribuíam para um aumento da sensibilidade do ensaio, tendo-se chegado a resultados promissores que tal acontece; (ii) em ensaios de fluorescência de modo a obter uma reta de calibração que possibilite a quantificação de antígenos Hsp70 em amostras reais, no entanto os resultados obtidos não foram satisfatórios; (iii) em ensaios em tiras de nitrocelulose com o intuito de proceder a um ensaio competitivo de ser fácil interpretação, os resultados obtidos indicam que tal é possível.

Utilizaram-se os bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-HRPII em ensaios de *Western-Blot* de forma detetar a presença de HRPII em diversas amostras obtidas ao longo do processo de produção e purificação e em culturas infetadas e não infetadas, revelando os resultados por quimioluminescência (método indireto) ou utilizando os bionanoconjugados (método direto) tendo-se concluído que a utilização dos bionanoconjugados para revelação é promissora, no entanto o método de quimioluminescência é mais sensível do que o método direto.

Palavras-chave: Malária; HRPII; Hsp70; ELISA; fluorescência; RDT



# Índice

Agradecimentos .....	v
Abstract .....	vii
Resumo .....	ix
Índice .....	xi
Lista de figuras .....	xv
Lista de tabelas .....	xxi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xxiii
1 - Objetivos.....	1
2 - Introdução .....	3
2.1 - Sistemas de expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> .....	3
2.1.1 - Hsp70 recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	3
2.1.2 - HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	4
2.1.3 - OmpF recombinante de <i>E. coli</i> .....	5
2.2 - Métodos de diagnóstico de malária .....	6
2.2.1 - Malária: a doença e a necessidade de diagnóstico .....	6
2.2.2 - Utilização de nanopartículas de ouro em imunoenaios .....	8
2.2.3 - Imunoenaios para detecção de malária .....	10
2.2.3.1 - Ensaio existentes.....	10
2.2.3.2 - Ensaio de fluorescência .....	12
2.2.3.3 - Ensaio ELISA .....	13
2.2.3.4 - Ensaio imunocromatográficos.....	14
2.2.3.5 - Western-Blot .....	16
3 - Procedimento Experimental .....	19
3.1 - Técnicas gerais.....	19
3.1.1 - Síntese de nanopartículas de ouro (AuNP) .....	19
3.1.2 - Caracterização das AuNP .....	19
3.1.3 - Método de BCA (ácido bicinonínico).....	19
3.1.4 - Eletroforese SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio, eletroforese em gel de poliacrilamida) .....	20
3.2 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes .....	20
3.2.1 - Hsp70 recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	20
3.2.1.1 - Expressão do plasmídeo <i>pHsp70</i> .....	20
3.2.1.2 - Produção de Hsp70 recombinante .....	20
3.2.1.3 - Purificação da Hsp70 recombinante .....	21
3.2.2 - HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
3.2.2.1 - Expressão do plasmídeo <i>pHRPII</i> .....	21

3.2.2.2 - Produção de HRPII recombinante .....	22
3.2.2.3 - Purificação de HRPII recombinante .....	22
3.2.2.4 - Crescimento de <i>E. coli</i> BL21 para produção de HRPII recombinante .....	23
3.2.3 - OmpF recombinante de <i>E. coli</i> .....	23
3.2.3.1 - Extração do plasmídeo <i>pGOmpF</i> de células <i>E. coli</i> BL21 .....	23
3.2.3.2 - Sequenciação do <i>pGOmpF</i> .....	24
3.2.3.3 - Transformação de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Omp8 (células competentes e inserção do plasmídeo) .....	24
3.2.3.4 - Transformação de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	25
3.2.3.5 - Extração do plasmídeo <i>pGOmpF</i> de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	25
3.2.3.6 - Produção de OmpF recombinante .....	25
3.3 - Aplicações de proteínas recombinantes de <i>Plasmodium falciparum</i> à detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção .....	26
3.3.1 - Interações anticorpo/antigénio (2E6/Hsp70) .....	26
3.3.1.1 - Produção e purificação do anticorpo monoclonal 2E6 .....	26
3.3.1.2 - Síntese de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6 (BSA)) .....	27
3.3.1.3 - Estabilidade de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6 (BSA)) ao longo do tempo, com a variação do pH do meio e com a variação da força iónica .....	27
3.3.1.4 - Ensaio de ELISA .....	27
3.3.1.5 - Ensaio de fluorescência .....	28
3.3.1.6 - Ensaio imunocromatográficos (em tiras de nitrocelulose) .....	29
3.3.2 - Interações anticorpo/antigénio (2G12/HRPII) .....	30
3.3.2.1 - Síntese de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12 (BSA)) .....	30
3.3.2.2 - Ensaio Western-Blot .....	30
4 - Resultados e discussão .....	31
4.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes .....	31
4.1.1 - Hsp70 recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> , produção e purificação .....	31
4.1.2 - HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	32
4.1.2.1 - Crescimento de <i>E. coli</i> BL21 para produção de HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	32
4.1.2.2 - Produção e purificação de HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	33
4.1.3 - OmpF recombinante de <i>E. coli</i> .....	38
4.1.3.1 - Extração do plasmídeo <i>pGOmpF</i> de células <i>E. coli</i> BL21 .....	39
4.1.3.2 - Transformação de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Omp8 .....	39
4.1.3.3 - Produção de OmpF recombinante .....	40
4.2 - Aplicações bionanotecnológicas de proteínas recombinantes de <i>Plasmodium falciparum</i> na detecção de malária recorrendo a métodos de imunodeteção .....	42
4.2.1 - Sistema anticorpo/antigénio, 2E6/Hsp70 .....	42
4.2.2 - Ensaio de ELISA .....	45

4.2.2.1 - Método de ELISA utilizando bionanoconjugados .....	45
4.2.2.2 - ELISA tradicional vs ELISA utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) .....	49
4.2.3 - Ensaio de Fluorescência .....	51
4.2.4 - Ensaio em tiras de nitrocelulose .....	57
4.2.5 - Ensaio de Western-blot.....	59
5 - Conclusões e perspectivas futuras.....	65
5.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes .....	65
5.2 - Aplicações bionanotecnológicas de proteínas recombinantes de <i>Plasmodium falciparum</i> na detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção .....	65
6 - Bibliografia .....	67
7 - Anexos.....	73
7.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes .....	73
7.1.1 - Meios de Cultura utilizados nas produções de proteínas recombinantes .....	73
7.1.1.1 - Meio SOC .....	73
7.1.1.2 - Meio LBagar .....	73
7.1.1.3 - Meio LB .....	73
7.1.2 - Hsp70 recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	73
7.1.2.1 - 1ª Produção .....	73
7.1.2.2 - 2ª Produção .....	75
7.1.2.3 - 3ª Produção .....	77
7.1.2.4 - 4ª Produção .....	78
7.1.3 - HRPII recombinante de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	79
7.1.3.1 - 1ª Produção .....	80
7.1.3.2 - 2ª Produção .....	82
7.1.3.3 - 4ª Produção .....	85
7.1.3.4 - 5ª Produção .....	86
7.1.3.5 - Curva de crescimento .....	79
7.1.4 - OmpF recombinante de <i>E. coli</i> .....	87
7.1.4.1 - 1ª Produção .....	87
7.1.4.2 - 2ª Produção .....	88
7.1.4.3 - 3ª Produção .....	89
7.1.4.4 - 4ª Produção .....	90
7.2 - Aplicações de proteínas recombinantes de <i>Plasmodium falciparum</i> à detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção .....	91
7.2.1 - Avaliação da estabilidade dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 (BSA) ao longo do tempo e com a variação do pH e da força iónica do meio.....	91
7.2.1.1 - Variação da força iónica.....	91
7.2.1.2 - Variação do pH .....	92

7.2.1.3 - Dynamic Light scattering (DLS) <sup>23</sup> .....	93
--------------------------------------------------------------	----

## Lista de figuras

Figura 2.1 Representação tridimensional da estrutura da proteína Hsp70 de <i>Plasmodium falciparum</i> . <sup>4</sup> .....	4
Figura 2.2 Estrutura 3D do homotrímero da OmpF. O primeiro monómero é exibido em desenho de forma a destacar a estrutura secundária, os outros dois monómeros estão com uma representação de superfície, os resíduos de triptofano estão representados a roxo e a verde e os resíduos do CR estão coloridos a azul (carga positiva) e a vermelho (carga negativa). <sup>13</sup> .....	6
Figura 2.3 Vista lateral do monómero da proteína OmpF, onde se encontram assinalados os dois resíduos de triptofano presentes no mesmo. <sup>14</sup> .....	6
Figura 2.4 Mapa mundial do risco de transmissão de malária. Figura adaptada. <sup>15</sup> .....	7
Figura 2.5 Representação esquemática do ciclo do <i>Plasmodium falciparum</i> no ser humano. <sup>17</sup> ....	7
Figura 2.6 Espectro de UV/VIS de uma solução de AuNP coloidal antes e após o fenómeno de agregação. ....	8
Figura 2.7 Esquema da utilização das AuNP em ensaios de ELISA. A – conjugação das AuNPs com o anticorpo secundário; B – Reação na placa de ELISA. ....	9
Figura 2.8 Esquema da formação dos bionanoconjugados utilizados. (a) Funcionalização com MUA (b) Conjugação de anticorpo (c) Bloqueamento com BSA. ....	10
Figura 2.9 <i>Trophozoites</i> em forma de anel provenientes de <i>Plasmodium falciparum</i> em filme de sangue A – espesso B – fino <sup>32</sup> .....	10
Figura 2.10 <i>Trophozoites</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> A - utilizando laranja de acridina e o método de microscopia de fluorescência com QBC; B - utilizando <i>benzothiocarboxypurine</i> e o método de microscopia de fluorescência. <sup>33</sup> .....	11
Figura 2.11 Sobreposição de um espectro de absorvância típico das AuNP com um espectro de emissão típico do Cy3B.....	12
Figura 2.12 Esquema ilustrativo do ensaio fluorimétrico competitivo. ....	13
Figura 2.13 Diferentes configurações possíveis dos ensaios de ELISA. A - Ensaio em sandwich direta; B - Ensaio em sandwich indireto; C - Ensaio competitivo. ....	14
Figura 2.14 Ilustração das diferentes camadas utilizadas nas placas de ELISA A) utilizando o anticorpo primário (2E6); B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6(BSA)). ....	14
Figura 2.15 Esquema de um RDT de fluxo lateral. ....	15
Figura 2.16 Esquema de ensaio competitivo em tiras de nitrocelulose.....	16
Figura 2.17 Esquema ilustrativo dos resultados esperados nos ensaios em tiras de nitrocelulose. ....	16
Figura 2.17 Esquema da montagem utilizada na técnica de <i>Western-Blot</i> . ....	17
Figura 3.1 Esquema do procedimento utilizado para as tiras de nitrocelulose. A - Resultado negativo B - Resultado positivo .....	30
Figura 4.1 Curva de crescimento de <i>E. coli</i> (DE3) B121 para a produção de HRPII recombinante.....	33
Figura 4.2 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15). M – marcador pesos moleculares (kDa); PI – alíquota pré-inóculo; AI – alíquota antes indução; DI – alíquota após indução; AC – alíquota após centrifugação; DF – alíquota após <i>French Press</i> ; AL – eluído antes de adição de tampão de lavagem; L12 – Eluído com tampão de lavagem; PAC – HRPII antes de concentração e troca de tampão; PF – HRPII após concentração. ....	34

Figura 4.3 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:2). 1 - HRPII recombinante (2 <sup>a</sup> produção, stock 1); 2 – HRPII recombinante (2 <sup>a</sup> Produção, stock 2); 3 – HRPII recombinante (1 <sup>a</sup> Produção) .....	35
Figura 4.4 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:2). M – marcador de peso molecular (kDa); E – eluído antes da adição de tampão de lavagem; 2 a 14 – frações eluídas com tampão de lavagem; 23 a 33 – frações eluídas com tampão de eluição.....	36
Figura 4.5 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h20, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1 a 4 – frações eluídas com tampão de lavagem; 8 e 11 – frações eluídas com tampão de eluição.....	36
Figura 4.6 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); E- eluído antes da adição de tampão de lavagem; 1 a 6 – frações eluídas com tampão de lavagem; 8 a 10 – frações eluídas com tampão de eluição. ....	37
Figura 4.7 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); P- proteína antes de concentração; [P] – proteína após concentração e troca de tampão; SC – eluído durante o processo de concentração; SL – eluído durante o processo de troca de tampão. ....	37
Figura 4.8 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 4 a 19 – frações eluídas com tampão de lavagem; 25 a 29 – frações eluídas com tampão de eluição. ....	38
Figura 4.9 Esquema ilustrativo dos <i>stocks</i> de DNA e das técnicas utilizadas para transformação e dos principais resultados obtidos. ....	39
Figura 4.10 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h20, amostras diluídas 1:3). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF final. ....	41
Figura 4.11 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h10, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF final. ....	41
Figura 4.12 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF antes da concentração e troca de tampão; 2 – OmpF final. ....	42
Figura 4.13 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função da concentração de sal (NaCl). ....	43
Figura 4.14 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função do valor de pH. ....	44
Figura 4.15 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função do tempo.....	44
Figura 4.16 Ilustração das diferentes camadas utilizadas nas placas de ELISA A) utilizando o anticorpo primário (2E6); B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6(BSA)). ....	45
Figura 4.17 Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 525 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6, com tempos de incubação de 15 minutos, 1 hora e durante a noite. ....	46
Figura 4.18 Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6, com diferentes razões de 2E6/AuNP indicadas em cada poço. ....	47
Figura 4.19 Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 525 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6, com diferentes razões de 2E6/AuNP nomeadamente 25, 50 e 75, mantendo a quantidade de ouro adicionada. ....	48
Figura 4.20 Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 450 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6 (livre ou conjugado). ....	49



Figura 4.21 Gráfico representativo da diferença de densidade ótica a 450 nm entre os bionanoconjugados e o anticorpo livre, em função da quantidade de 2E6.....	50
Figura 4.22 Sobreposição de um espectro de absorvância típico das AuNP com um espectro de absorvância típico do OPD <sup>60</sup> .....	50
Figura 4.23 Reação entre o OPD e o peróxido de hidrogénio para formação do produto de cor laranja (2,3-Diaminophenazine).....	51
Figura 4.24 Esquema ilustrativo do ensaio fluorimétrico competitivo. ....	51
Figura 4.25 Intensidade de fluorescência a 574 nm em função do tempo (minutos) de uma solução de antígeno (Hsp70) marcado com o fluoróforo (Cy3B), de uma solução de antígeno marcado com fluoróforo juntamente com os bionanoconjugados e de uma solução de antígeno marcado com fluoróforo juntamente com os bionanoconjugados e com o antígeno livre. ....	52
Figura 4.26 Intensidade de fluorescência relativa (percentagem) em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 120 vezes superior à de AuNP, como método descrito por Guirgis <i>et al</i> <sup>27</sup> .....	53
Figura 4.27 Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, método descrito por Guirgis <i>et al</i> <sup>27</sup> .....	53
Figura 4.28 Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, método descrito por Guirgis <i>et al</i> <sup>27</sup> .....	54
Figura 4.29 Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de parasitas numa amostra infetada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP. ....	54
Figura 4.30 Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, com adição consecutiva de alíquotas de 2 µL de solução de Hsp70. As medições foram efetuadas ao tempo inicial após a adição do antígeno e 20 minutos após a adição do antígeno. ....	55
Figura 4.31 Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de parasitas numa amostra infetada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, com adição consecutiva de alíquotas de 2 µL de cultura. As medições foram efetuadas ao tempo inicial após adição do antígeno.....	55
Figura 4.32 Diferentes formas de ligação do anticorpo às AuNP, modificando a distância da zona de ligação do anticorpo ao antígeno em relação às AuNP. A) Distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP de 12 nm; B) Distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP de 5 a 10 nm; C) distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP inferior a 5 nm. ....	56
Figura 4.33 Esquema de ensaio competitivo em tiras de nitrocelulose.....	57
Figura 4.34 Esquema ilustrativo dos resultados esperados nos ensaios em tiras de nitrocelulose. ....	57
Figura 4.35 Tiras de nitrocelulose contendo 187 µg de Hsp70, 20 µL de anti-IgG e mergulhadas em 5 mL de AuNP-MUA-2E6, 10 nM. ....	58
Figura 4.36 Tiras de nitrocelulose contendo 187 µg de Hsp70, anti-IgG com diluição de 5 ou 2,5 vezes e incubadas 1 ou 16 horas. ....	58
Figura 4.37 Tiras de nitrocelulose contendo 187 µg Hsp70, anti-IgG com uma diluição de 2,5 vezes, secas durante 16 horas e mergulhadas em 5 mL de AuNP-MUA-2E6 contendo quantidades de Hsp70 entre 0 e 250 µg. ....	59
Figura 4.38 Esquema ilustrativo de um teste de diagnóstico rápido para a deteção de Hsp70....	59

Figura 4.39 Detecção da presença de HRPII recombinante ao longo do processo de produção e purificação da proteína. Revelação dos resultados de *Western-Blot* A) por quimioluminescência B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12). M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura de *E. coli* antes de indução com ITPG; 3 - Cultura de *E. coli* após de indução com ITPG; 4 - *Pellet* após 1ª centrifugação; 5 - Amostra após a *French Press*; 6 - Eluído da coluna de Ni-NTA; 7 - Eluído com tampão de lavagem; 8 - Proteína (HRPII) final, 0,34 mg/mL. ....60

Figura 4.40 Detecção da presença de HRPII em cultura de eritrócitos infetada, cultura não infetada e num controlo de plasma humano de dador saudável. Revelação dos resultados de *Western-Blot* utilizando anti-HRPII comercial A) por quimioluminescência B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-anti-HRPII). M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - HRPII 0,2 mg/mL; 6 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 7 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 8 - Cultura não infetada; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 100 vezes; 10 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes. ....61

Figura 4.41 Detecção da presença de HRPII em cultura de eritrócitos infetada, não infetada e num controlo de plasma humano de dador saudável. Revelação dos resultados de *Western-Blot* onde se utilizou 2G12 (fornecido pela Professora Doutora Diane Taylor) A) por quimioluminescência; M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 6 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 7 - Cultura não infetada; 8 - Plasma humano de dador saudável diluído 5 vezes; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes. B) Utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12); M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - HRPII 0,2 mg/mL; 6 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 7 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 8 - Cultura não infetada; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 100 vezes; 10 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes. ....62

Figura 7.1 Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:2). M – Padrão de pesos moleculares (kDa); A1 a A4 – eluído com tampão de eluição. ....73

Figura 7.2 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.1 e o Log10 da massa molecular das proteínas. ....74

Figura 7.3 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (1ª Produção) antes de concentração e troca de tampão. ....74

Figura 7.4 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (1ª Produção) após concentração e troca de tampão. ....75

Figura 7.5 Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); Hsp70 – proteína final obtida. ....75

Figura 7.6 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.5 e o Log10 da massa molecular das proteínas. ....76

Figura 7.7 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (2ª Produção) após concentração e troca de tampão. ....76

Figura 7.8 Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 3:1 ou 2:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); N30 – Hsp70 recombinante antes de concentração e troca de tampão, diluída 3:1; N20 – Hsp70 recombinante antes de concentração e troca de tampão, diluída 2:1; C30 – Hsp70 recombinante após concentração e troca de tampão, diluída 3:1; C20 – Hsp70 recombinante após concentração e troca de tampão, diluída 2:1. ....77

Figura 7.9 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.8 e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas.....	77
Figura 7.10 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (3ª Produção) antes e após concentração e troca de tampão. ....	77
Figura 7.11 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 2 a 11 – frações eluídas com tampão de lavagem;13 a 14 – frações eluídas com tampão de eluição.....	78
Figura 7.12 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); Hsp70 – proteína final obtida após concentração e troca de tampão. ....	78
Figura 7.13 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (4ª Produção) após concentração e troca de tampão. ....	79
Figura 7.14 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h10, amostras diluídas 1:2). M – marcador de pesos moleculares (kDa); A2 – amostra antes da purificação; 2 a 6 – eluído com tampão de lavagens; 9 a 13 – eluído com tampão de eluição; F – proteína final. ....	80
Figura 7.15 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.14 e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas.....	80
Figura 7.16 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (1ª Produção) antes de concentração e troca de tampão. ....	81
Figura 7.17 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (1ª Produção) após concentração e troca de tampão. ....	81
Figura 7.18 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:3). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 1 a 9 – Frações eluídas com tampão de eluição.....	82
Figura 7.19 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.18e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas.....	82
Figura 7.20 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) antes da concentração e troca de tampão. ....	83
Figura 7.21 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) após concentração e troca de tampão. ....	84
Figura 7.22 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) após 2 semanas. ....	85
Figura 7.23 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante, frações referente à 4ª produção.....	85
Figura 7.24 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante obtida na 5ª produção. ....	86
Figura 7.25 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); Amostras recolhidas ao longo de todo o crescimento de <i>E.coli</i> BL21 para produção de HRPII recombinante utilizando 400 $\mu\text{M}$ de IPTG.....	79
Figura 7.26 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); Amostras recolhidas ao longo de todo o crescimento de <i>E.coli</i> BL21 para produção de HRPII recombinante utilizando 50 $\mu\text{M}$ de IPTG.....	80
Figura 7.27 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.10 e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas.....	87

Figura 7.28 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 1ª produção. ....	87
Figura 7.29 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.11 e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas. ....	88
Figura 7.30 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 2ª produção. ....	88
Figura 7.31 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 2 – OmpF final obtida. ....	89
Figura 7.32 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 3ª produção. ....	89
Figura 7.33 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.12 e o $\text{Log}_{10}$ da massa molecular das proteínas. ....	90
Figura 7.34 Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 4ª produção. ....	90
Figura 7.35 Representação dos espectros de absorvância de AuNP com a variação da força iônica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M. ....	91
Figura 7.36 Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA com a variação da força iônica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M. ....	91
Figura 7.37 Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA-2E6 com a variação da força iônica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M. ....	92
Figura 7.38 Representação dos espectros de absorvância de AuNP com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13. ....	92
Figura 7.39 Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13. ....	93
Figura 7.40 Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA-2E6 com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13. ....	93

## Lista de tabelas

Tabela 2.1 Vantagens e desvantagens da utilização de bactérias <i>E. coli</i> como hospedeiro. Tabela adaptada. <sup>1</sup> .....	3
Tabela 2.3 Resumo das principais características dos três principais antígenos utilizados em RDT para detecção de malária. ....	11
Tabela 2.4 Vantagens e desvantagens da revelação direta e indireta em <i>western-blot</i> . <sup>46</sup> .....	17
Tabela 3.1 Resumo dos parâmetros utilizados ao longo das diferentes produções. ....	22
Tabela 3.2 Resumo dos métodos e condições utilizadas para a concentração e troca de tampão da HRP II. ....	23
Tabela 3.3 Parâmetros testados ao longo das produções de OmpF recombinante .....	26
Tabela 4.1 Resultados obtidos durante a produção e purificação de Hsp70 recombinante. ....	31
Tabela 4.2 Parâmetros testados e resultados obtidos durante a produção e purificação de HRP II recombinante. ....	34
Tabela 4.3 Valores de concentração dos 2 <i>stocks</i> da 2ª produção (Figura 7.22) .....	35
Tabela 4.4 Resultados obtidos através do método de BCA para as concentrações das frações em estudo. ....	38
Tabela 4.5 Parâmetros obtidos após a extração de DNA plasmídeo. ....	39
Tabela 4.6 Principais diferenças entre as produções e quantidade de OmpF recombinante obtida em cada produção. ....	40
Tabela 7.1 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.3. ....	74
Tabela 7.2 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.4. ....	75
Tabela 7.3 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.7. ....	76
Tabela 7.4 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.10. ....	78
Tabela 7.5 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.13. ....	79
Tabela 7.6 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.16. ....	81
Tabela 7.7 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.17. ....	82
Tabela 7.8 Valores de concentração obtidos de acordo com Figura 7.20 .....	83
Tabela 7.9 Valores de concentração obtidos de acordo com Figura 7.21. ....	84
Tabela 7.10 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.22. ....	85
Tabela 7.11 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.23. ....	86
Tabela 7.12 Valores de concentração obtidos através da Figura 7.24. ....	86
Tabela 7.13 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.28. ....	87
Tabela 7.14 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.30. ....	88
Tabela 7.15 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.32. ....	89
Tabela 7.16 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.34. ....	90



## Lista de abreviaturas e símbolos

**2E6:** anticorpo monoclonal anti-*heat shock protein 70*

**2G12:** anticorpo monoclonal anti-*histine rich protein II*

**AuNP:** nanopartículas de ouro

**AuNP-MUA:** nanopartículas de ouro revestidas com ácido mercaptoundodecanóico

**AuNP-MUA-2E6(BSA):** nanopartículas de ouro revestidas com ácido mercaptoundodecanóico conjugadas com o anticorpo monoclonal 2E6, anti-*heat shock protein 70* bloqueadas com albumina de soro de bovino

**AuNP-MUA-2G12(BSA):** nanopartículas de ouro revestidas com ácido mercaptoundodecanóico conjugadas com o anticorpo monoclonal 2G12, anti-*histine rich protein II*, bloqueadas com albumina de soro de bovino

**BSA:** albumina de soro de bovino

**Cy3B:** fluoróforo de cianina 3B

**DLS:** dispersão dinâmica da luz

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**HRPII:** *histidine rich protein II*

**Hsp70:** *heat shock protein 70*

**Hsp70-Cy3B:** *heat shock protein 70* marcada com o fluoróforo de cianina 3B

**IF:** intensidade de fluorescência

**Ig:** imunoglobina

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

**LB:** meio Luria-Bertani

**LBagar:** meio Luria-Bertani agar

**LDH:** lactato desidrogenase

**MUA:** ácido mercaptoundodecanóico

**Omp:** *outer membrane protein*

**OPD:** o-Phenilenediamina

**PBS:** tampão fosfato-salino

**QBC:** *quantitative buffer coat*

**RDT:** testes de diagnóstico rápido

**SDS:** dodecil-sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** dodecil-sulfato de sódio, eletroforese em gel de poliacrilamida

**SPR:** ressonância plasmônica de superfície

**SOC:** meio super-ótimo com repressão catabólica

**UV-Vis:** espectroscopia de ultravioleta/visível





## 1 - Objetivos

A presente tese apresenta dois principais objetivos, a expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes e aplicações bionanotecnológicas de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* na detecção de malária utilizando métodos de nanoimunodeteção.

Um dos objetivos deste trabalho foi a otimização dos processos de expressão, produção e purificação de três proteínas recombinantes designadas por *Heat Shock protein 70* (Hsp70) proteína da família das chaperones produzida em situações de *stress* e proveniente do *Plasmodium falciparum*, um dos parasitas responsáveis pela malária; a *Histone Rich protein II* (HRPII) também produzida pelo *Plasmodium falciparum* e a *Outer Membrane protein F* (OmpF) proteína transmembranar de células de *E. coli* que auxilia da difusão de moléculas para o interior da célula.

Outro objetivo desta tese é a utilização da HRPII e da Hsp70 como antígenos na detecção de malária através da sua interação com os respetivos anticorpos monoclonais (2G12 e 2E6), assim como a conjugação destes anticorpos com nanopartículas de ouro, formando bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 e AuNP-MUA-2G12. Sendo que se averiguará a estabilidade através da deslocação da SPR, utilizando espectroscopia de ultravioleta/visível, quando se varia a força iónica e o valor de pH do meio, e ao longo do tempo.

Pretende-se a caracterização da utilização dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 em imunoensaios em vários formatos (i) ensaios de ELISA em sandwich de forma a verificar se estes possibilitam um aumento da sensibilidade do ensaio; (ii) ensaios competitivos de fluorescência de forma a obter uma reta de calibração que permita a quantificação do antígeno Hsp70 em amostras reais; (iii) ensaios de tiras de nitrocelulose num ensaio competitivo de fácil interpretação. Os bionanoconjugados AuNP-MUA-2G12 foram utilizados em ensaios de *Western-blot* para a detecção do antígeno HRPII.



## 2 - Introdução

### 2.1 - Sistemas de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Neste trabalho pretende-se a produção de três proteínas recombinantes, a Hsp70, a HRP2, que podem ambas ser utilizadas como antígeno de malária, e da OmpF, que tem um papel importante na regulação da entrada de antibióticos em células de *E. coli*. Para a obtenção destas proteínas recombinantes utilizam-se sistemas de sobreexpressão de *E. coli*.

Uma proteína recombinante é uma proteína codificada por um gene que foi inserido num sistema capaz de a expressar, através de técnicas de DNA recombinante. Para aplicar este tipo de técnicas é necessário proceder à escolha de um vetor de expressão (bactérias, fungos, leveduras) que irá variar com os requisitos e com as aplicações da proteína recombinante a produzir.<sup>1</sup>

A escolha do hospedeiro para a produção de proteínas recombinantes não só afeta a produção da proteína, mas também a forma pela qual o produto pode ser posteriormente purificado. Desta forma a *E. coli* é normalmente a escolha pois este é um sistema muito utilizado e do qual se possui um vasto conhecimento.<sup>1</sup>

Na Tabela 2.1 pode-se observar algumas vantagens e desvantagens na escolha de bactérias *E. coli* como hospedeiro para a produção de proteínas recombinantes.

**Tabela 2.1 Vantagens e desvantagens da utilização de bactérias *E. coli* como hospedeiro. Tabela adaptada.<sup>1</sup>**

Hospedeiro	Vantagens	Desvantagens
<b>Bactéria <i>E. coli</i></b>	Sistema extensamente conhecido	Sem modificações pós-transdução
	Muita variedade de escolha de vetores	A atividade biológica e a imogenicidade podem ser diferentes da proteína natural
	Expressão de genes facilmente controlada	Endotoxicidade das bactérias gram-negativas
	Fácil crescimento	

#### 2.1.1 - Hsp70 recombinante de *Plasmodium falciparum*

A *Heat Shock protein 70* (Hsp70) é uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 70 kDa que tem o máximo da sua expressão quando o organismo se encontra em situações de *stress*, nomeadamente quando se encontra exposto a temperaturas elevadas. Esta família de proteínas auxilia uma vasta gama de processos nas células e possui funções de manutenção celular ao nível de enrolamento de proteínas, funções nas vias de transdução de sinais e funções na garantia da qualidade das proteínas e reparação das mesmas em caso de erros.<sup>2</sup>

As atividades mais conhecidas destas proteínas baseiam-se na capacidade das mesmas em interagir com segmentos peptídicos de proteínas hidrofóbicas de uma forma controlada por ATP. As diferentes funções da Hsp70 ocorrem através de<sup>2</sup>:

- Ampliação e diversificação dos genes Hsp70 em evolução, o que origina chaperones especializados;
- Recrutamento de co-chaperones para cumprir funções específicas;
- Cooperação da Hsp70 com outras chaperones para cumprir funções específicas.

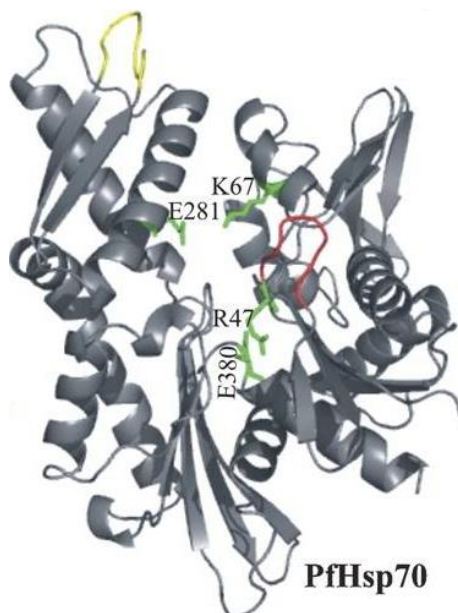
Esta é uma proteína produzida por uma grande variedade de organismos, incluindo os humanos, no entanto no decorrer deste trabalho apenas se irá discutir a Hsp70-1 produzida pelo

*Plasmodium falciparum*, o parasita responsável pelo maior número de casos de malária e o mais mortífero.<sup>3</sup>

Esta proteína possui um papel essencial na adaptação do parasita ao hospedeiro, o que tem levado a que se tenha tornado alvo de estudo para a sua aplicação em vacinas.<sup>4</sup>

A nível da sua estrutura a proteína possui um domínio N-terminal de ligação de nucleótidos (NBD), com 45 kDa, que está ligado ao domínio de ligação do substrato (SBD) através de uma região vinculadora que está envolvida na regulação alostérica da NBD e atividade da SBD (domínio com 15 kDa) e por fim um domínio C-terminal, com 10kDa.<sup>5</sup>

Na Figura 2.1 é possível observar uma representação da estrutura secundária da Hsp70 vista do topo.



**Figura 2.1** Representação tridimensional da estrutura da proteína Hsp70 de *Plasmodium falciparum*.<sup>4</sup>

A Hsp70-1 (proteína em estudo) é expressa durante o ciclo exoeritrócito do *Plasmodium falciparum*, altura em que o parasita ainda não infetou os eritrócitos, está localizada no núcleo e no citoplasma das células. A Hsp70 é uma proteína solúvel em água.<sup>4</sup>

A Hsp70-1 é uma das seis Hsp70 produzidas pelo *Plasmodium falciparum*, tem sido o maior alvo de estudos a nível das suas atividades como chaperone e como possível alvo para o desenvolvimento de uma vacina. As outras Hsp70 são a Hsp70-2 localizada no retículo endoplasmático e a Hsp70-3 localizada na mitocôndria, que formam complexos com as suas homólogas de outros organismos eucariontes; a Hsp70-x situada no citoplasma é uma homóloga da Hsp70-1; a Hsp70-z localizada no citoplasma e a Hsp70-y no retículo endoplasmático.<sup>4</sup>

### 2.1.2 - HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum*

A PfHRPII (HRPII de *Plasmodium falciparum*) é uma proteína com um peso molecular situado entre os 50 e os 105 kDa, é solúvel em água e possui uma cadeia de 277 aminoácidos. Esta cadeia de aminoácidos é composta por 34% de Histidinas, 37% de alaninas e 10% de ácido aspártico e contem 51 repetições do tri-péptido AHH.<sup>6,7</sup>

Esta proteína é sintetizada e encontra-se presente durante todo o ciclo de vida assexuado do parasita *Plasmodium falciparum*, ciclo que será descrito posteriormente, como proteína exposta à superfície dos eritrócitos infetados.<sup>6</sup> Na fase final do ciclo, quando se dá a rutura dos eritrócitos infetados, a HRPII é libertada para o plasma sanguíneo e tem a capacidade de circular no sangue em concentrações que podem atingir os micromolar.<sup>7</sup>

As funções exatas da HRPII não estão totalmente esclarecidas, no entanto diversas teorias são aceites como funções possíveis da proteína. A HRPII estará envolvida na destoxificação dos grupos hemo livres convertendo-os em hemozoína inativa, na remodelação do citoesqueleto dos eritrócitos infetados, na modulação da resposta imunitária e na ligação de iões  $Zn^{2+}$ .<sup>6,7</sup>

A HRPII é o antígeno de eleição para a deteção de malária em testes de diagnóstico rápido pois esta proteína encontra-se na circulação sanguínea em concentrações que permite a sua deteção mesmo com um nível de parasitemia baixo (250 parasitas/ $\mu$ L)<sup>6</sup> e a elevada especificidade da PfHRPII com o seu anticorpo monoclonal permite a sua aplicação em testes de diagnóstico com uma sensibilidade e especificidade semelhante à da técnica de microscopia ótica e que não exigem mão-de-obra especializada ou infraestruturas complexas.<sup>8</sup>

No entanto para níveis de parasitemia mais baixos (< 200 parasitas/ $\mu$ L), o facto desta ser uma proteína polimórfica (possui sequências diferentes consoante a zona endémica do parasita da qual é isolada) influencia a sua deteção<sup>6</sup>. Como a HRPII é estável no plasma consegue permanecer em circulação com concentrações possíveis de ser detetada até várias semanas (mais do que 5 semanas<sup>9</sup>) após a eliminação do parasita<sup>7</sup>. A sensibilidade dos testes também sofre uma variação consoante a faixa etária dos pacientes aos quais são aplicados<sup>9</sup>.

### 2.1.3 - OmpF recombinante de *E. coli*

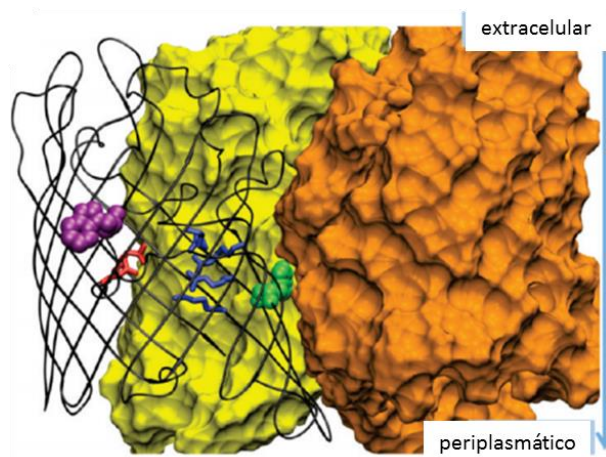
As bactérias *E. coli* são um dos principais agentes etiológicos responsáveis por infeções hospitalares e comunitárias, e as opções terapêuticas estão a ficar limitadas devido à resistência aos antibióticos, como os da família  $\beta$ -lactam, que as mesmas têm vindo a adquirir.<sup>10</sup>

As porinas são proteínas que formam canais essenciais na membrana exterior de bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, e normalmente formam complexos triméricos que criam canais cheios de água de forma a possibilitar a difusão facilitada de várias moléculas com um peso molecular até 600 Da.<sup>11,12</sup>

De entre a família de porinas a OmpF tem sido a selecionada para a maioria dos estudos pois esta é considerada o maior canal para a passagem de antibióticos da família  $\beta$ -lactam e quinolona.<sup>13</sup>

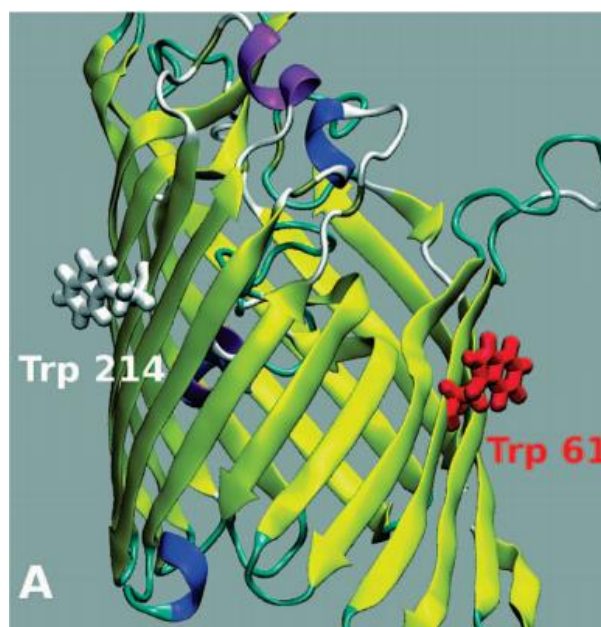
A OmpF é uma porina de difusão geral (difusão não seletiva), no entanto, alguns antibióticos conseguem estabelecer uma ligação fraca com resíduos da proteína, facilitando assim o seu fluxo.<sup>13</sup>

A estrutura geral do trímero da proteína OmpF é composta por uma região de constrição (CR) devido a um *loop* L3, que se dobra para dentro do canal formando um impedimento estérico e electrostático. Esta zona é caracterizada por um campo elétrico forte e transversal gerado por resíduos carregados negativamente voltados para um conjunto de resíduos carregados positivamente (Figura 2.2).<sup>13</sup>



**Figura 2.2** Estrutura 3D do homotrímero da OmpF. O primeiro monómero é exibido em desenho de forma a destacar a estrutura secundária, os outros dois monómeros estão com uma representação de superfície, os resíduos de triptofano estão representados a roxo e a verde e os resíduos do CR estão coloridos a azul (carga positiva) e a vermelho (carga negativa).<sup>13</sup>

A estrutura da OmpF, tal como acontece como as outras porinas, é a de um trímero onde cada monómero possui dois resíduos de triptofano (Figura 2.3) que vão auxiliar a passagem dos antibióticos para o interior da célula.<sup>14</sup>



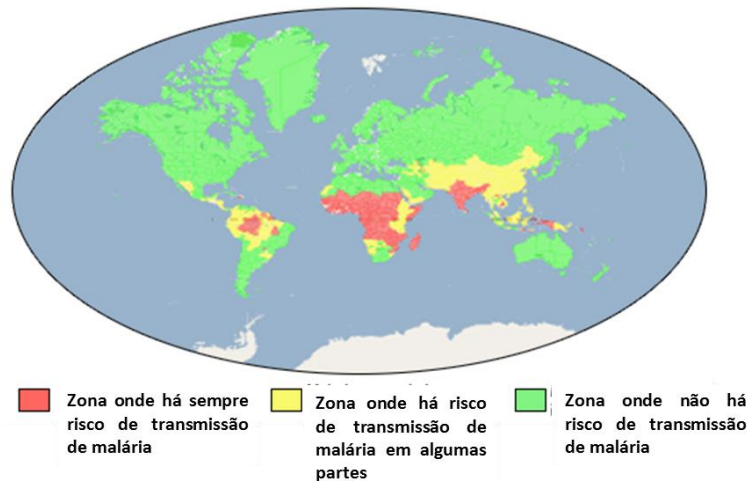
**Figura 2.3** Vista lateral do monómero da proteína OmpF, onde se encontram assinalados os dois resíduos de triptofano presentes no mesmo.<sup>14</sup>

## 2.2 - Métodos de diagnóstico de malária

### 2.2.1 - Malária: a doença e a necessidade de diagnóstico

A malária é uma doença infecciosa aguda provocada por uma picada de um mosquito fêmea de mais de 30 espécies do género *Anopheles*. Em 2011 3,3 mil milhões de pessoas encontravam-se em risco de contágio.<sup>3</sup>

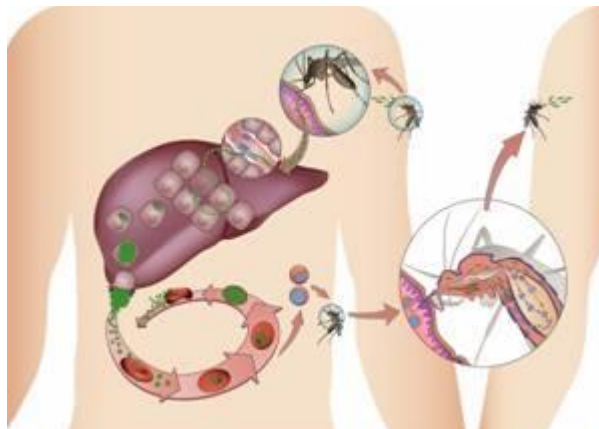
A Figura 2.4 apresenta a distribuição mundial do risco de infeção por malária.



**Figura 2.4 Mapa mundial do risco de transmissão de malária. Figura adaptada.**<sup>15</sup>

A malária é provocada por cinco espécies de parasitas do género *Plasmodium*, nomeadamente o *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium ovale*, o *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium knowleri*; sendo o mais mortal e comum o *Plasmodium falciparum*.<sup>3</sup>

A infeção de malária inicia-se quando os esporozoítos do *Plasmodium* entram no hospedeiro, através da picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. Estes esporozoítos migram pela corrente sanguínea até atingirem o fígado onde vão infectar os hepatócitos e evoluem para merozoítos. Os merozoítos ao entrarem na corrente sanguínea vão invadir os eritrócitos e iniciar o ciclo de replicação que acaba com a libertação de novos merozoítos para a corrente sanguínea. Alguns destes merozoítos vão evoluir de forma a formar gametócitos que serão incorporados por mosquitos na altura de uma nova picada (Figura 2.5).<sup>16</sup>



**Figura 2.5 Representação esquemática do ciclo do *Plasmodium falciparum* no ser humano.**<sup>17</sup>

Os primeiros sintomas de malária surgem 10 a 15 dias após a picada do mosquito, e são muito semelhantes aos de uma gripe. Alguns dos sintomas são febre, dor de cabeça e muscular, náuseas, vômitos e em alguns casos pode ocorrer anemia e icterícia. Caso não seja atempadamente tratada pode levar a insuficiência renal, convulsões, coma e por fim conduzir mesmo à morte.

Devido à dificuldade de diagnóstico de malária a partir dos sintomas desta doença, durante vários anos aos pacientes que apresentassem estado febril, em zonas de risco de transmissão de malária, era administrado o tratamento para a malária. Tal administração indiscriminada de fármacos anti-maláricos levou a que o parasita adquirisse resistência a esses fármacos.<sup>18</sup>

Neste momento o método mais fiável de diagnóstico de malária é feito com recurso à técnica de microscopia ótica. No entanto este tipo de diagnóstico implica a existência de mão-de-obra especializada, o que não acontece na maioria das zonas onde o risco de transmissão é maior.<sup>18</sup>

Desta forma houve a necessidade do desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido (RDT). Os testes atualmente existentes baseiam-se em três antígenos de malária, a HRPII, a aldolase e a lactato desidrogenase (LDH). Os testes que detetam a HRPII têm como desvantagens o facto de só poderem ser usados quando a infeção é provocada pelo *Plasmodium falciparum* e da HRPII permanecer em circulação durante várias semanas após o final da infeção. Os testes baseados em LDH, são menos sensíveis do que os baseados na HRPII, mas a LDH desaparece de circulação pouco tempo após o final da infeção. Os testes baseados em aldolase conseguem detetar a infeção provocada pelos diferentes parasitas, no entanto são testes poucos estáveis e sensíveis a temperaturas ambiente elevadas e a níveis de humidade elevados.<sup>9,18,19</sup>

### 2.2.2 - Utilização de nanopartículas de ouro em imunoensaios

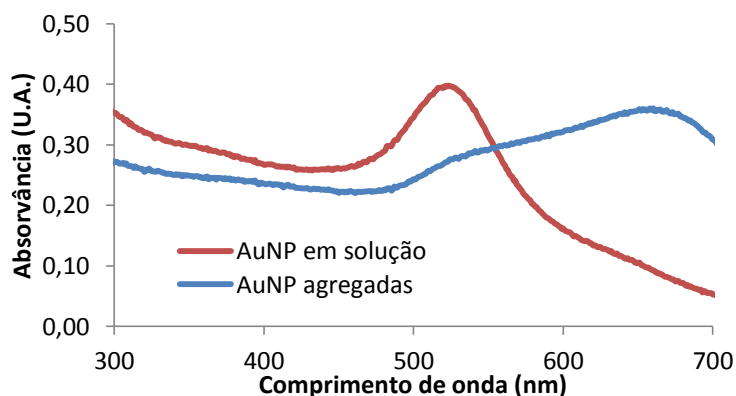
As nanopartículas de ouro (AuNP) são entidades com um diâmetro situado entre 1 a 100 nm rodeadas por um agente de revestimento que lhes confere propriedades químicas que possibilitam a sua funcionalização posterior.<sup>20</sup>

As AuNP são sintetizadas pela redução química ou eletroquímica de ouro (III) na presença de um agente redutor. O tamanho e a forma das partículas são controlados através das condições experimentais, nomeadamente do agente redutor utilizado, do tempo de reação, da temperatura e do agente de revestimento. O método de síntese de partículas mais utilizado, pela sua simplicidade na preparação de partículas esféricas, é o método de Turkevich que se baseia na redução de um sal de ouro por uma solução de citrato de sódio.<sup>21</sup>

As AuNPs possuem propriedades óticas únicas, como o coeficiente de extinção elevado e uma banda de ressonância plasmónica de superfície (SPR), que tem levado ao seu estudo e aplicação em diversos ensaios.<sup>21</sup>

A SPR é um fenómeno que ocorre quando radiação eletromagnética incide sobre uma superfície metálica e entra em ressonância com os eletrões da banda de condução do metal.<sup>22</sup> Este é o fenómeno responsável pela cor vermelha das AuNP, cuja banda SPR está situada por volta dos 520 nm.<sup>23</sup>

Quando se destabiliza a solução de AuNP ocorre o fenómeno de agregação das mesmas e uma mudança na cor de vermelho para azul. Esta destabilização pode ser conseguida através do aumento da força iónica ou da alteração do pH do meio, contribuindo ambos os efeitos para o cancelamento das cargas superficiais proporcionadas pelo agente de revestimento. Esta agregação provoca uma deslocação da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados.



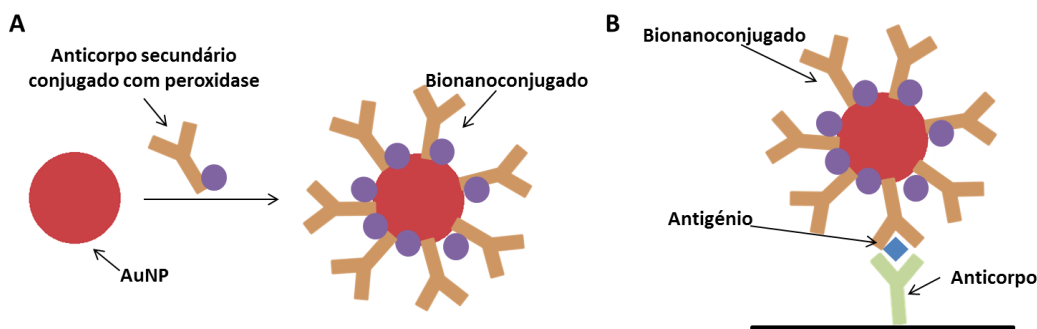
**Figura 2.6** Espectro de UV/VIS de uma solução de AuNP coloidal antes e após o fenómeno de agregação.



Atualmente as AuNPs são utilizadas em ensaios de diagnóstico com três diferentes abordagens: a utilização da mudança de cor de vermelho para azul quando ocorre agregação das mesmas (alteração do comprimento de onda da SPR para um comprimento de onda superior; Figura 2.6), a utilização das AuNP como suporte para diversas biomoléculas, e a utilização eletroquímica das AuNPs acopladas a outros metais de forma a aumentar o sinal emitido. Tal como outras nanopartículas as AuNPs podem ser conjugadas com ácidos nucleicos, anticorpos e hidratos de carbono.<sup>21</sup>

A aplicação das AuNP em imunoenaios tem vindo a aumentar durante a última década.<sup>24</sup> Nomeadamente a sua utilização em ensaios de ELISA<sup>25,26</sup>, em ensaios de fluxo lateral<sup>22</sup> e em ensaios fluorimétricos<sup>27</sup>.

Em ensaios de ELISA as AuNP têm sido utilizadas em conjugação com o anticorpo secundário ou detetor conjugado com uma peroxidase e funcionam como suporte do anticorpo ampliam o sinal do substrato catalisado pela peroxidase (Figura 2.7).<sup>25,26</sup>

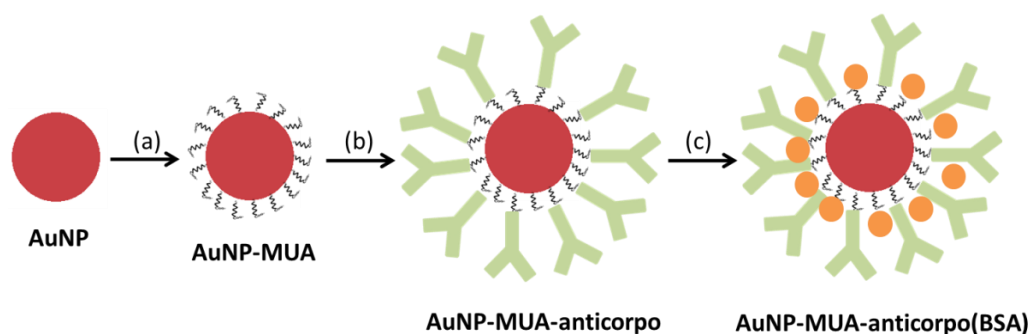


**Figura 2.7** Esquema da utilização das AuNP em ensaios de ELISA. A – conjugação das AuNPs com o anticorpo secundário; B – Reação na placa de ELISA.

Nos ensaios de fluxo lateral as AuNPs desempenham uma dupla função de suporte de anticorpos e de interpretação pela cor vermelha.<sup>28</sup> As AuNPs podem ainda ser conjugadas com HRP (*Horseradish peroxidase*) de forma a ocorrer catálise do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidineda), que origina um produto de cor azul, e assim aumentar a intensidade da cor final.<sup>29</sup> Este tipo de testes são um dos produtos mais importantes da indústria de diagnóstico pois são fáceis de por em prática, são baratos e fáceis de interpretar.<sup>22</sup>

Em ensaios fluorimétricos explora-se a capacidade das AuNP de provocarem fenómenos de *quenching* (atenuação de fluorescência) ou de *enhancement* (aumento da intensidade de fluorescência).<sup>27</sup>

No presente trabalho pretende-se utilizar as AuNP, com o agente de revestimento MUA (ácido mercaptoundecanóico) e conjugadas com o anticorpo monoclonal anti-Hsp70 (2E6) e dois anticorpos monoclonais anti-HRP II (2G12 e outro comercial) e ambos bloqueados com BSA. Na Figura 2.8 pode-se observar um esquema da formação dos bionanoconjugados a serem utilizados neste trabalho.



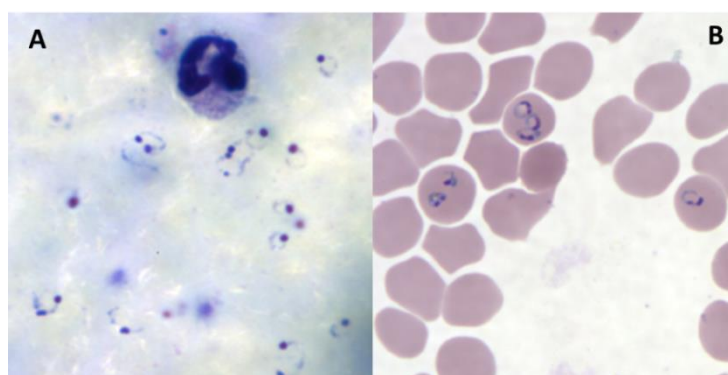
**Figura 2.8** Esquema da formação dos bionanoconjugados utilizados. (a) Funcionalização com MUA (b) Conjugação de anticorpo (c) Bloqueamento com BSA.

A conjugação dos anticorpos às AuNP pode ser feita de uma forma covalente ou não covalente. A ligação covalente pressupõe a utilização de um agente de reticulação em que uma das suas extremidades se vai ligar às AuNP e a outra extremidade liga-se de uma forma covalente aos anticorpos. Neste trabalho utilizou-se uma abordagem não covalente na qual podem ocorrer três tipos de interações que levam à ligação do anticorpo às AuNP, estas são o efeito de coulomb, interações hidrofóbicas e interação por pontes de hidrogénio.<sup>30</sup> A conjugação das proteínas com as AuNPs é feita em dois passos, sendo o primeiro rápido e em que a absorção da proteína ocorre por interações electrostáticas entre a superfície carregada das AuNPs e da proteína; e o segundo passo é mais lento e ocorre um rearranjo que poderá levar ou não à substituição do agente de revestimento e que pode envolver a interação com resíduos internos da proteína.<sup>20</sup>

## 2.2.3 - Imunoensaios para deteção de malária

### 2.2.3.1 - Ensaios existentes

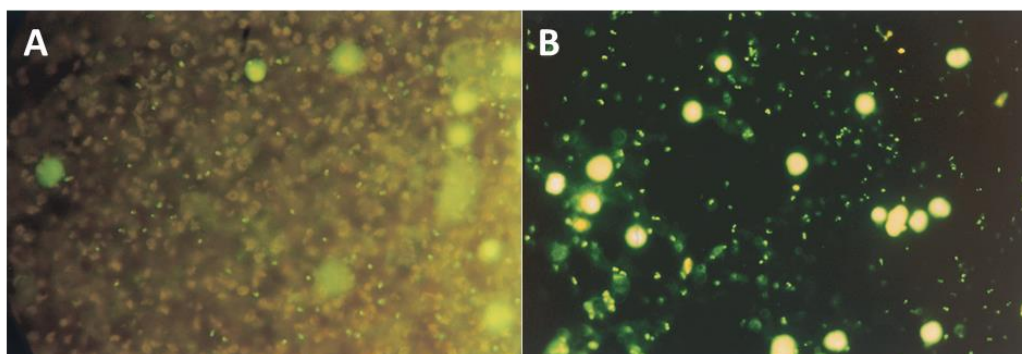
Neste momento o teste de eleição para a deteção de malária é a microscopia ótica. Esta técnica pode ser aplicada com recurso a filmes de sangue espessos, os quais possuem diversas camadas de eritrócitos, onde se contam o número de parasitas presentes num campo de microscópio ou o número de parasitas por cada cem leucócitos. A microscopia ótica também pode ser aplicada utilizando filmes de sangue finos, neste caso existe apenas uma camada de eritrócitos espalhados e permite uma melhor análise da morfologia dos parasitas, no entanto estes filmes tornam a técnica menos sensível.<sup>31</sup>



**Figura 2.9** Trophozoites em forma de anel provenientes de *Plasmodium falciparum* em filme de sangue A – espesso B – fino<sup>32</sup>

Outra técnica de microscopia utilizada para a deteção de malária é a microscopia de fluorescência. Alguns fluoróforos têm uma afinidade elevada para alguns dos ácidos nucleicos do núcleo do parasita e quando estes fluoróforos se ligam aos ácidos nucleicos e são irradiados com uma luz UV ao comprimento de onda de excitação emitem fluorescência de uma forma intensa. Os fluoróforos mais utilizados são o laranja de acridina e o benzotiocarboxipurina quando irradiados a 490 nm emitem uma cor verde e amarela respetivamente. Este método é

muitas vezes combinado com o método de QBC onde a amostra é separada em camadas através de centrifugação.<sup>33</sup> Na Figura 2.10 pode-se observar um resultado de microscopia de fluorescência utilizando o laranja de acridina em conjunto com o QBC.



**Figura 2.10** *Trophozoites de Plasmodium falciparum* A - utilizando laranja de acridina e o método de microscopia de fluorescência com QBC; B - utilizando *benzothiocarboxypurine* e o método de microscopia de fluorescência.<sup>33</sup>

Alguns *kits* de testes de ELISA para detecção de malária já são comercializados atualmente, baseando-se na detecção da LDH<sup>34</sup> pelo método de sandwich direta (Figura 2.13 A) no qual se imobiliza na placa um anticorpo que se vai ligar à LDH. Seguidamente adiciona-se o anticorpo conjugado com uma peroxidase. Outro kit baseia-se em anticorpos IgG (imunoglobina G) e IgM (imunoglobina M) pelo método de sandwich indireto (Figura 2.13 B) em que na placa se encontra imobilizado o antígeno ao qual se vão ligar os IgGs e os IgM de *Plasmodium falciparum*. Seguidamente adicionam-se anticorpos anti-IgG e anti-IgM conjugados com uma peroxidase<sup>35</sup>.

Apesar de com estas técnicas serem obtidos resultados satisfatórios, estas são técnicas demoradas e que exigem infraestruturas e mão-de-obra especializada, que não existem em muitas zonas endêmicas de malária.

Desta forma houve a necessidade do desenvolvimento de testes rápidos para a detecção da malária. Como anteriormente referido os testes rápidos existentes para a detecção de malária baseiam-se em três antígenos, a HRP II, a aldolase e a LDH, sendo os testes baseados na HRP II os mais comuns. Na Tabela 2.2 encontram-se resumidas as principais características destes três antígenos.

**Tabela 2.2** Resumo das principais características dos três principais antígenos utilizados em RDT para detecção de malária.

Antígeno	
HRP II <sup>18,33</sup>	<p>Produzida apenas por <i>Plasmodium falciparum</i>.</p> <p>Produzida em concentrações elevadas.</p> <p>Persiste no sangue até várias semanas após o tratamento da doença.</p>
LDH e aldolase <sup>18,33,36</sup>	<p>Produzida por todas as espécies de parasitas.</p> <p>Enzima importante da glicólise do parasita.</p> <p>Desaparece rapidamente da corrente sanguínea após o tratamento da doença.</p> <p>Os testes baseados neste antígeno são menos sensíveis que os da HRP II.</p>

A maioria destes testes possui uma validade extensa (em média 2 anos) e são estáveis a temperatura numa gama de 1°C a 30°C ou 40°C. Nas zonas endémicas de malária muitas vezes são atingidas temperaturas superiores a este máximo e a elevada humidade que se faz sentir nas mesmas zonas também prejudica a estabilidade destes testes.<sup>18,37</sup>

### 2.2.3.2 - Ensaio de fluorescência

A fluorescência é um processo no qual algumas moléculas emitem luz quando existe excitação eletrónica resultante de mecanismos físicos (como absorção de luz), mecânicos (como fricção) ou químicos e resulta da propriedade de estas moléculas serem capazes de absorver luz num determinado comprimento de onda e de emitirem luz num comprimento de onda maior num determinado intervalo de tempo.<sup>38</sup>

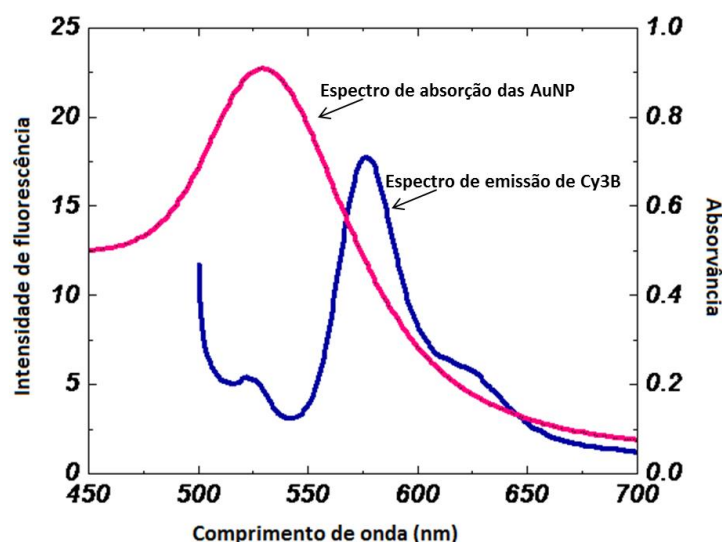
A utilização de nanopartículas de ouro em imunoenaios para deteção de proteínas ou vírus em ensaios de fluorescência começou a ser desenvolvida recentemente.<sup>39</sup>

Estes imunoenaios exploram dois fenómenos passíveis de ocorrer quando se juntam AuNP com um fluoróforo: *quenching* de fluorescência e *enhancement* de fluorescência.<sup>39,40</sup>

O fenómeno de *enhancement* corresponde a um aumento no valor da intensidade de fluorescência quando o fluoróforo e as AuNP se encontram a uma distância entre 5 a 10 nm<sup>41</sup> enquanto o fenómeno de *quenching* corresponde a uma diminuição do valor da intensidade de fluorescência quando o fluoróforo e as AuNP se encontram a uma distância máxima de 5 nm<sup>42</sup>.

Wang *et al*<sup>43</sup> utilizam um ensaio fluorométrico para a deteção de um polimorfismo de uma cadeia de DNA, através da imobilização da cadeia molde nas AuNP e uma cadeia complementar a uma zona da mesma contendo o fluoróforo é ligada a esta através de hibridação. No caso de uma nova cadeia completamente complementar ser adicionada, a cadeia contendo o fluoróforo desliga-se e existe um aumento da intensidade de fluorescência em solução.<sup>43</sup>

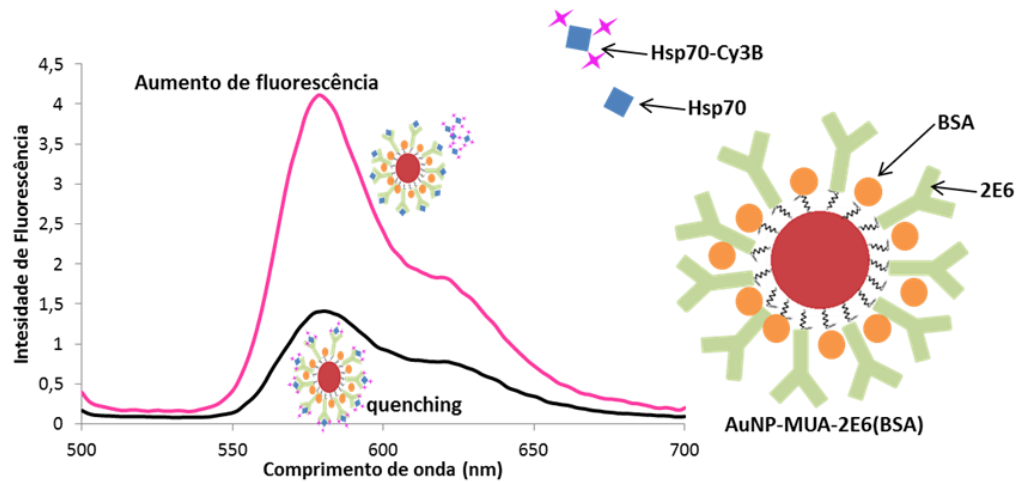
No presente trabalho pretende-se explorar o fenómeno de *quenching* de acordo com o descrito anteriormente por Guirgis *et al*<sup>27</sup>. Neste caso o fenómeno de quenching ocorre devido a uma sobreposição do espectro de absorvância das AuNP com o espectro de emissão do fluoróforo Cy3B, como é possível observar na Figura 2.11.



**Figura 2.11** Sobreposição de um espectro de absorvância típico das AuNP com um espectro de emissão típico do Cy3B.

Pretende-se testar um imunoensoio competitivo em solução onde estarão presentes bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6), antígeno marcado com um fluoróforo (Hsp70-Cy3B) e o antígeno livre (Hsp70), como analito.

Neste ensaio quando não existe em solução antígeno livre existirá *quenching* da fluorescência pois os bionanoconjugados ligar-se-ão ao antígeno marcado com o fluoróforo. À medida que se aumentar a quantidade de antígeno livre em solução a intensidade de fluorescência vai aumentando pois vai-se favorecendo a ligação do antígeno não marcado aos bionanoconjugados no lugar da ligação do antígeno marcado com o fluoróforo. Na Figura 2.12 pode-se observar um esquema deste imunensaio.



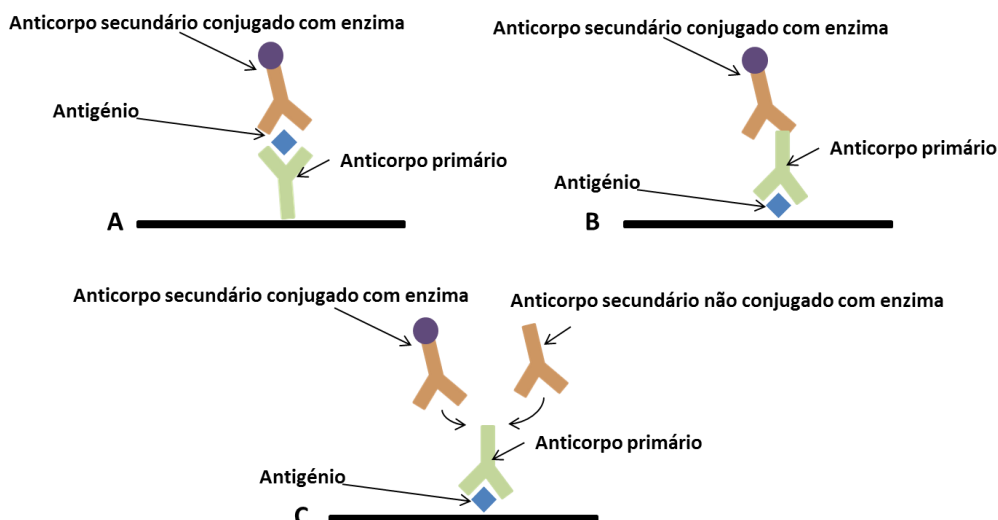
**Figura 2.12** Esquema ilustrativo do ensaio fluorimétrico competitivo.

Este ensaio será aplicado a amostras de proteína pura e a amostras de culturas de eritrócitos infectadas e não infectadas.

### 2.2.3.3 - Ensaio ELISA

Os ensaios de ELISA consistem em imunensaio nos quais um dos reagentes se encontra imobilizado numa fase sólida e o “gerador de sinal” é uma enzima que vai catalisar a reação de um substrato originando um produto com cor, sendo esta cor o sinal. Estes ensaios vieram simplificar a quantificação de antígenos e a detecção de anticorpos e são neste momento os métodos de eleição para o diagnóstico de doenças como a SIDA, hepatites, alergias entre outras.<sup>44</sup>

Este ensaio pode ser utilizado com diferentes configurações, como a configuração em *sandwich*, e a configuração de ensaio competitivo (Figura 2.13).

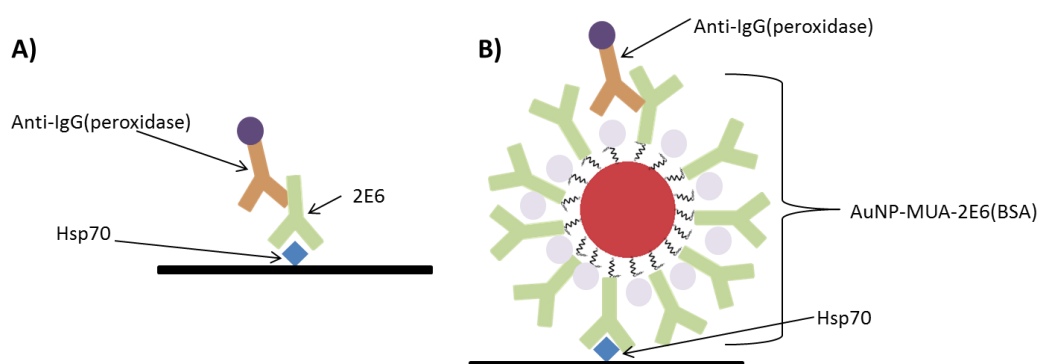


**Figura 2.13** Diferentes configurações possíveis dos ensaios de ELISA. A - Ensaio em sandwich direta; B - Ensaio em sandwich indireto; C - Ensaio competitivo.

Independentemente da configuração escolhida os ensaios de ELISA são compostos por um sistema de captura, um analito (substância que se pretende detetar) e o sistema de deteção (por exemplo um espectrofotómetro). Para escolher a configuração mais adequada ao sistema em estudo deve ter-se em conta se se pretende proceder a uma quantificação ou apenas a deteção, o tipo de ligação e o tamanho do antígeno, a sensibilidade e precisão desejada e o tempo disponível para a recolha de dados.<sup>44</sup>

De modo a aumentar a sensibilidade dos ensaios de ELISA têm-se desenvolvido sistemas nos quais as AuNPs são funcionalizadas com o anticorpo, que se encontra conjugado com a enzima que vai atuar como gerador de sinal, funcionando como suporte do mesmo e auxiliando na reação enzimática aumentando a sua velocidade.<sup>25,26</sup>

Neste trabalho utilizam-se ensaios de ELISA para detetar a presença do antígeno Hsp70, em amostras de proteína pura, num ensaio com a configuração de ensaio em sandwich, mostrada na Figura 2.14.



**Figura 2.14** Ilustração das diferentes camadas utilizadas nas placas de ELISA A) utilizando o anticorpo primário (2E6); B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6(BSA)).

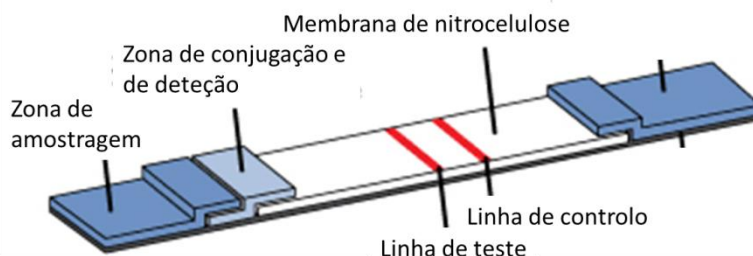
#### 2.2.3.4 - Ensaios imunocromatográficos

A maioria deste tipo de ensaios baseia-se na captura de um analito numa superfície sólida e promove a ligação do mesmo com uma molécula que permite a sua deteção.<sup>45</sup>



Existem quatro tipos de testes, os de fluxo lateral, os “*flow-through*”, os de aglutinação e os de fase sólida. Estes testes são aplicados para a detecção de diferentes analitos (como por exemplo anticorpos e antígenos) em várias amostras (como urina e sangue).<sup>45</sup>

Nos testes de fluxo lateral adiciona-se a amostra na zona de amostragem e a amostra migra ao longo do teste chegando à zona de conjugação. Nesta zona está imobilizada a molécula detetora que vai migrar em conjunto com a amostra ao longo do teste até atingir a zona de detecção. A zona de detecção é composta pela linha de teste e pela linha de controlo.<sup>45</sup>



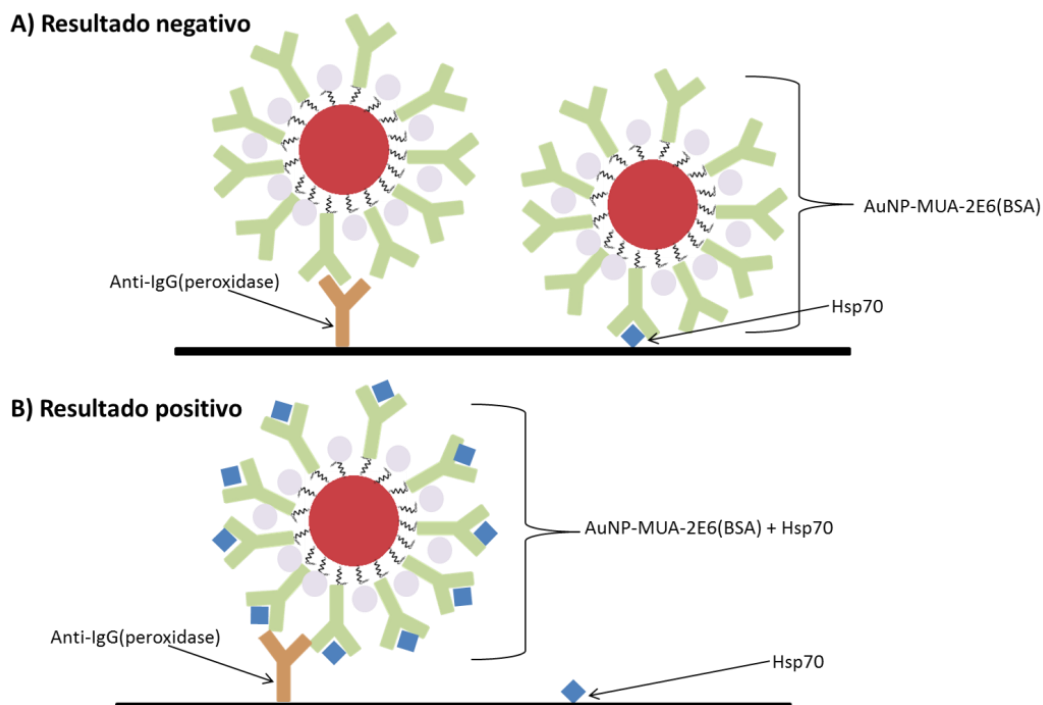
**Figura 2.15 Esquema de um RDT de fluxo lateral.**

Nos testes de “*flow-through*” amostra é depositada e migra através da membrana de reação até atingir a zona absorvente. Este é um tipo de teste menos sensível que os testes de fluxo lateral.<sup>45</sup>

Os testes de aglutinação pressupõem um processo no qual uma molécula forma agregados insolúveis quando o analito é adicionado. Estes testes utilizam partículas de latex ou de gelatina, ou até mesmo células. Nestes testes a amostra é adicionada a numa lâmina de microscópio e seguidamente adiciona-se a solução com o detetor do analito que vai levar, ou não, à formação de agregados sólidos, o que corresponde a um teste positivo para a presença do analito. Muitas vezes este é um teste de difícil interpretação.<sup>45</sup>

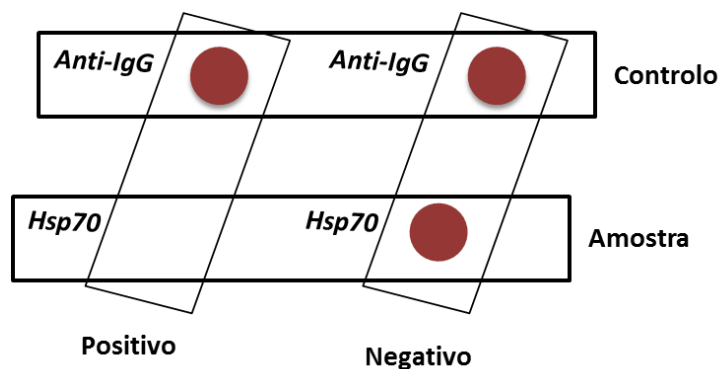
Os testes de fase sólida permitem detetar vários analitos simultaneamente, num suporte não poroso onde se encontram imobilizadas as moléculas captadoras que mudam de cor quando se adiciona o analito.<sup>45</sup>

No presente trabalho pretende-se efetuar um ensaio competitivo onde os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) vão reagir em solução com o analito e depois nessa mesma solução será mergulhada uma tira de nitrocelulose onde estão imobilizados o antígeno (Hsp70) e um anticorpo secundário (anti-IgG). Os bionanoconjugados ligar-se-ão à zona onde está imobilizado o anti-IgG independentemente da amostra conter ou não o antígeno (zona de controlo), mas só se ligará à zona onde se encontra imobilizado na tira o antígeno caso a amostra não contenha o mesmo. (Figura 2.16)



**Figura 2.16** Esquema de ensaio competitivo em tiras de nitrocelulose.

Os resultados esperados encontram-se esquematizados na Figura 2.17. Como se trata de um ensaio competitivo, na zona onde se encontra o antígeno imobilizado apenas se espera obter a cor vermelha, proveniente das AuNP, caso da amostra não contenha o antígeno. Na zona onde o anti-IgG se encontra imobilizado é sempre esperada a cor vermelha.

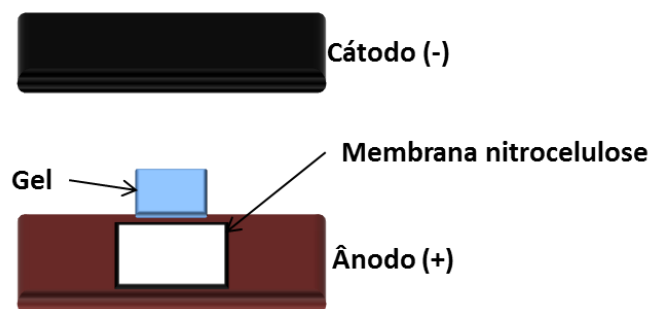


**Figura 2.17** Esquema ilustrativo dos resultados esperados nos ensaios em tiras de nitrocelulose.

### 2.2.3.5 - Western-Blot

Este método começa com a separação das proteínas contidas na amostra através da técnica de SDS-PAGE e estas são depois transferidas para uma membrana de nitrocelulose por diversos métodos, como por exemplo a transferência por capilaridade, por convecção térmica acelerada ou por eletroeluição, sendo esta última a técnica mais comum. A eletroeluição é executada colocando a membrana de nitrocelulose junto do gel obtido por SDS-PAGE entre dois elétrodos onde se aplica um campo elétrico (Figura 2.18). A membrana é depois bloqueada de forma a evitar ligações não-específicas.<sup>46</sup>





**Figura 2.18** Esquema da montagem utilizada na técnica de *Western-Blot*.

A detecção neste método pode ser feita de uma forma direta ou indireta, sendo que na forma direta o anticorpo primário está envolvido na detecção, enquanto na forma indireta é necessária a utilização de um anticorpo secundário. Na Tabela 2.3 pode-se observar algumas vantagens e desvantagens de cada uma destas técnicas.

**Tabela 2.3** Vantagens e desvantagens da revelação direta e indireta em *western-blot*.<sup>46</sup>

	Vantagens	Desvantagens
<b>Direta</b>	Mais rápida.	Pouca amplificação de sinal
	Não há possibilidade de reatividade cruzada do anticorpo secundário.	A marcação pode reduzir a imunorreatividade dos anticorpos.
<b>Indireta</b>	O anticorpo secundário consegue amplificar o sinal.	Podem ocorrer reações não específicas.
	Existem no mercado uma grande variedade de anticorpos secundários com marcadores.	Exige mais passos de reação.

A detecção é efetuada recorrendo a marcadores enzimáticos ou fluorescentes. No caso dos marcadores enzimáticos um dos métodos utilizados consiste na utilização de um substrato quimioluminescente que reage com uma enzima produzindo luz que pode ser capturada por uma película fotográfica numa câmara escura.<sup>46</sup>

Neste trabalho foi utilizado um substrato de *enhancement* de quimioluminescência baseado em luminol (SuperSignalWestPico Chemiluminescent substrate) que vai ser catalisado pela HRP conjugada com o anticorpo secundário, produzindo o 3-aminofalato, responsável pela luz emitida.

Recorrendo a esta técnica pretende-se testar a utilização de AuNP-MUA conjugadas com um anticorpo monoclonal anti-HRP II como método de detecção direta de forma a detetar a proteína HRP II em diversas amostras e comparar com os resultados obtidos utilizando um substrato quimioluminescente.



### 3 - Procedimento Experimental

Em todas as técnicas efetuadas foram usados reagentes da marca *Sigma-Aldrich* de elevada pureza.

Todas as medições de espectroscopia de UV/Visível foram efetuadas utilizando um espectrofotómetro *Varian* modelo *Cary 50 Bio* acoplado ao *software Cary winUV* e com recurso a células de quartzo, exceto para a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em que se utilizou um espectrofotómetro com leitor de placas *Infinitive® 200 Pro series* acoplado ao *software Tecan i-control*, à temperatura de 24°C.

As medições de pH foram efetuadas utilizando o medidor de pH *CRISON Basic 20+*.

As composições dos meios de cultura utilizados encontram-se descritas nos Anexos 1 e 2.

Salvo indicação a centrífuga utilizada foi a 5804 R da *Eppendorff*.

#### 3.1 - Técnicas gerais

##### 3.1.1 - Síntese de nanopartículas de ouro (AuNP)

As nanopartículas de ouro (AuNP) utilizadas durante todo o trabalho foram sintetizadas de acordo com o método de *Turkevich* (adaptado) descrito por *J. Kimling*<sup>47</sup>, e baseia-se na redução de um sal de ouro ( $\text{HAuCl}_4$ ) por uma solução de citrato de sódio 1% p/v.

Para um volume final de 250 mL de AuNP, preparou-se uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  1,25 mM, e esta foi aquecida, em refluxo até à ebulição. Neste ponto adicionou-se solução de citrato de sódio 1% de modo a se obter uma concentração final de  $\text{HAuCl}_4$  de 1 mM. A solução mudou de cor passando de amarelo para cinzento e depois para vermelho, cor indicativa da formação de nanopartículas de ouro esféricas.

Passados 15 minutos desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até atingir a temperatura ambiente. As AuNP foram armazenadas a 4°C.

##### 3.1.2 - Caracterização das AuNP

A sua qualidade foi avaliada pela observação da ressonância plasmónica de superfície (SPR). As AuNP apresentam, no seu espectro de absorvância, uma banda definida que corresponde à SPR, com um máximo de absorvância por volta dos 520 nm.

A sua concentração foi determinada de acordo com o método descrito por *Haiss et al*<sup>48</sup>. Através deste método é possível determinar o diâmetro médio das partículas a partir do quociente entre o valor de absorvância da SPR e do valor de absorvância a 450 nm.

A partir do valor do diâmetro obtido é possível determinar o valor do coeficiente de extinção molar a 450 nm ( $\epsilon_{450\text{nm}}$ ). Obtido este valor e de forma a se obter calcular a concentração das AuNP, aplica-se a equação de Lambert-Beer (Equação 3.1)

**Equação 3.1**  $A = c \cdot l \cdot \epsilon_{450}$

##### 3.1.3 - Método de BCA (ácido bicinconínico)

Este método foi efetuado de acordo com o protocolo descrito pela *Sigma- Aldrich*.<sup>49</sup>

Misturou-se a solução A (ácido bicinconínico) e a solução B (Solução de sulfato de cobre, 4%) numa proporção de 50:1 (50 partes de solução A para 1 de solução B). Em diferentes alíquotas desta mistura diluiu-se uma solução de BSA (albumina de soro de bovino) 1 mg/mL variando as quantidades adicionadas entre 0 e 24 µg, assim como quantidades previamente definidas da amostra, de acordo com a proteína em estudo.

Deixou-se reagir durante 30 minutos a 60°C e fez-se uma leitura do valor da absorvância a 562 nm, utilizando-se uma célula de poliestireno ou de quartzo. Com os valores obtidos construiu-se uma reta de calibração para a obtenção dos valores de concentração da proteína em estudo.

### 3.1.4 - Eletroforese SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio, eletroforese em gel de poliacrilamida)

Para a avaliação da produção e purificação das proteínas em estudo, foi necessária a realização da técnica de SDS-PAGE.

Para esta técnica utilizou-se uma fonte de alimentação da *Biorad* aplicando uma corrente de 150 V, com o gel mergulhado em tampão de corrida (1,92 M glicina, 0,25 M Tris e 1% p/v SDS) e esperando que a frente de solvente (com uma coloração de azul de *comassie*) atingisse o final do gel.

Utilizou-se uma percentagem de acrilamida/poliacrilamida (BioRad) de 10%. As amostras utilizadas foram diluídas em tampão de amostra (20% v/v glicerol; 10 mM Mercaptoetanol; 10% p/v SDS, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 0,05% p/v azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C durante 7 minutos. Utilizaram-se marcadores da *nzytech* de alto e baixo peso molecular.

A coloração dos géis foi feita utilizando uma solução de azul de coomassie 0,5% p/v, e o excesso de corante foi removido utilizando uma solução descorante (7,5% v/v ácido acético, 45% metanol).

As amostras correspondentes a células não lisadas foram centrifugadas a 19.300 xg, durante 10 minutos, a 4°C. o *pellet* foi ressuspensionado numa solução SDS a 10% e passados 30 minutos, de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram agitadas no vórtex (VELP Scientific 2x3).

O peso molecular das bandas, observadas nos diversos géis, foi obtido através da relação linear entre o logaritmo de base 10 da massa molecular das proteínas do padrão e as respectivas mobilidades relativas ( $R_f$ , quociente entre a distância migrada pela proteína e a distancia migrada pela frente de solvente).

## 3.2 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes

### 3.2.1 - Hsp70 recombinante de *Plasmodium falciparum*

#### 3.2.1.1 - Expressão do plasmídeo *pHsp70*

O plasmídeo utilizado para a expressão da Hsp70 foi amavelmente cedido pelo Doutor Tonderayi Matambo (*Rhodes University*, Africa do Sul) e este foi inserido em células de *E. coli Rosetta Blue*<sup>TM</sup> pelo Doutor Gonçalo Doria e pelo Mestre Bassem Guirgis (ambos a trabalhar na altura na FCT/UNL).

Resumidamente 10 ng de plasmídeo foram adicionados a 20 µL de células de *E. coli Rosetta Blue*<sup>TM</sup> e estas forma incubadas durante 5 minutos em gelo. Seguidamente foram aquecidas a 42°C por 30 segundos e colocadas novamente em gelo durante 2 minutos. O meio SOC foi adicionada à mistura e incubado a 37°C, 250 rpm durante 1 hora. As células foram então adicionadas a uma placa contendo meio LB-agar e antibióticos (100 µg/mL de ampicilina, 34 µg/mL de clorofenicol e 12,5 µg/mL de tetraciclina) e incubadas durante a noite a 37°C.

#### 3.2.1.2 - Produção de Hsp70 recombinante

O procedimento de produção de Hsp70 recombinante foi executado de acordo com Matambo *et al*<sup>50</sup> com algumas alterações.

Procedeu-se à inoculação das células contendo o plasmídeo (*pHsp70*) em meio LBagar, contendo ampicilina 100 µg/mL, clorofenicol 34 µg/mL e tetraciclina 12,5 µg/mL, deixou-se incubar durante a noite a 37°C.

Verificou-se o aparecimento de colônias isoladas e adicionou-se uma delas a meio LB, o qual continha os antibióticos acima mencionados. Deixou-se a incubar durante 16 h a 37°C e 210 rpm.

Adicionou-se o resultante a 2 L de meio LB, com os respectivos antibióticos. Deixou-se incubar a 37°C e 210 rpm até ser atingida uma densidade ótica a 600 nm entre 0,5 e 0,6. Neste ponto adicionou-se IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida) 1 mM e deixou-se incubar 16 h, a 37°C e 210 rpm.

O resultante foi centrifugado a 4°C, 9.000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga *Beckman Coulter Avanti J26-XPI*, rotor JA10).

Posteriormente ressuspendeu-se o *pellet* em tampão de lise (8 M Ureia, 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazole, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM de lizosima, 800  $\mu$ L de inibidor de protease) adicionou-se um pouco de DNase e levou-se à *French Press* (*French pressure cell press*, *Thermo Electron Corporation*, Alemanha), fazendo 3 passagens a 2.000 psi, de forma a partir as células.

Voltou-se a centrifugar durante 90 minutos a 7000 rpm e 4°C, de forma a eliminar os resíduos insolúveis e recuperou-se o sobrenadante.

### 3.2.1.3 - Purificação da Hsp70 recombinante

Para a purificação da proteína utilizou-se uma resina de níquel-NTA agarose (Quiagen). Misturou-se a resina, previamente equilibrada com 2 volumes de tampão de lavagem (10 mM Imidazole, 300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8), com o sobrenadante anterior, em agitação reduzida durante 2 horas, a 4°C. Compactou-se a resina e adicionou-se tampão de lavagem até ser atingida uma densidade ótica, a 280 nm, inferior a 0,1. Sendo este valor atingido iniciou-se a adição do tampão de eluição (100 mM Imidazole, 300 mM, 10 mM Tris pH 8), de forma a recolher a proteína em estudo, até ser atingida uma densidade ótica a 280 nm inferior a 0,1 nm.

Procedeu-se então à troca de tampão das amostras recolhidas para o tampão borato de sódio a pH 8 e à concentração das mesmas. Para tal utilizou-se um *diaflo* (Amicon 8050) com um limite de exclusão de 30 kDa, exceto na última purificação onde se utilizou um *centricon* (Millipore) com um limite de exclusão de 3 kDa, centrifugando em ciclos de 5 minutos, a 7500 xg.

### 3.2.2 - HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum*

#### 3.2.2.1 - Expressão do plasmídeo *pHRPII*

O plasmídeo *pHRPII* foi amavelmente cedido pelo Professor Doutor Daniel Goldberg (*Washington University, EUA*) e encontrava-se liofilizado em papel de filtro.

Segundo a Doutora Inês Gomes, ao plasmídeo liofilizado adicionou-se tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH7,0; EDTA 1 mM), e centrifugou-se a 15000 rpm durante 1 minuto, de forma a partir as fibras do papel de filtro.

Retirou-se o sobrenadante ao qual se adicionou dois volumes de etanol absoluto frio (*Panreac*) e acetato de sódio 3 M (*Riedel-de Haën*). Deixou-se durante a noite a -20°C.

Posteriormente centrifugou-se durante 20 minutos a 4°C e 15300 rpm. Ressuspendeu-se o *pellet* em etanol 70% frio (*Panreac*) e centrifugou-se 20 minutos, a 4°C e 15300 rpm. Procedeu-se à secagem do *pellet* utilizando o *speed vacum* durante 2 minutos. Adicionou-se água autoclavada e deixou-se a 4°C durante 2 horas.

Após este procedimento foi determinada a concentração de plasmídeo obtido utilizando um espectrofotómetro *Nanodrop* (*Thermo scientific Nanodrop 2000C*).

Foi efetuado um gel de agarose a 1% de forma a verificar se o plasmídeo estaria presente, este gel foi revelado utilizando um corante vermelho (gel *red*, *Biotium*). Adicionaram-se as amostras (que continham três partes de plasmídeo para uma de tampão de carga e também a DNA *ladder*). Ao gel aplicou-se uma corrente de 100 V durante 1 hora.

De forma a transformar as células das estirpes de *E. coli* selecionadas (BL21) misturou-se as células e o plasmídeo numa proporção de 5:1 e deixou-se durante 50 minutos no gelo. Seguidamente colocou-se durante 90 segundos a 42°C, e depois novamente 5 minutos em gelo. Adicionou-se meio SOC à mistura e incubou-se a 37°C, 250 rpm durante 1 hora. Adicionou-se então as células a uma placa contendo meio LBagar e ampicilina a 100 µg/mL. Deixou-se incubar durante a noite a 37°C.

### 3.2.2.2 - Produção de HRPII recombinante

Inicialmente o processo de produção de HRPII recombinante baseou-se no descrito por Ndonwi *et al*<sup>7</sup>.

Procedeu-se à inoculação do *pHRPII* em meio LBagar, contendo ampicilina 100 µg/mL, e deixou-se incubar durante a noite a 37°C.

Verificou-se o aparecimento de colónias isoladas e adicionou-se uma delas a 50 ml de meio LB, o qual continha ampicilina 100 µg/mL. Deixou-se a incubar durante 16 h a 37°C e 180 rpm.

Adicionou-se 200 µL do resultante a 2 L de meio LB, com ampicilina 100 µg/mL, e deixou-se incubar a 37°C e 180 rpm até ser atingida uma densidade ótica a 600 nm de 0,6. Neste ponto adicionou-se IPTG 0,4 mM e deixou-se incubar 16 horas, a 25°C e 180 rpm.

Este passo foi alterado em produções posteriores de forma a aumentar a eficiência da mesma. As alterações encontram-se descritas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** Resumo dos parâmetros utilizados ao longo das diferentes produções.

	Volume de inoculo inicial (L)	OD (600 nm) para indução	[IPTG] (mM)	Temperatura de incubação após indução (°C)	Tempo de incubação após indução (horas)
<b>1ª Produção</b>	2	0,6	0,4	25	16
<b>2ª Produção</b>	4	0,6	0,4	25	16
<b>4ª Produção</b>	4	0,8	0,05	16	20
<b>5ª Produção</b>	4	0,8	0,05	16	20

O resultante foi centrifugado a 4°C, 10.000 rpm durante 40 minutos (Centrifuga *Beckman Coulter Avanti J26-XPI*, rotor JA10).

Posteriormente ressuspendeu-se o *pellet* em tampão de ligação (Tris 20 mM pH 8, NaCl 50 mM, Imidazole 50 mM, cocktail inibidor de protease), adicionou-se um pouco de DNase e levou-se à *French Press* (*French pressure cell press, Thermo Electron Corporation, Alemanha*), fazendo 3 passagens a 2.000 psi, de forma a partir as células.

Centrifugaram-se as mesmas durante 90 minutos a 7.000 rpm e 4°C, de forma a eliminar os resíduos insolúveis e recuperou-se o sobrenadante.

### 3.2.2.3 - Purificação de HRPII recombinante

Para a purificação da proteína utilizou-se uma resina de níquel-NTA, previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. Misturou-se a resina com o sobrenadante anterior, a 4°C

durante 2h. Compactou-se a resina e adicionou-se tampão de lavagem (20 mM Tris pH 8, 500 mM de NaCl, 250mM de Imidazole) até ser atingida uma densidade ótica, a 280 nm, inferior a 0,1. Sendo este valor atingido iniciou-se a adição de tampão de eluição (20 mM Tris pH 8, 500 mM de NaCl, 1 M de Imidazole), de forma a recolher a proteína, até ser atingida uma densidade ótica 280 nm inferior a 0,1.

Procedeu-se à troca de tampão das amostras para TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) e à concentração da proteína. Para este passo foram testadas três diferentes técnicas, descritas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Resumo dos métodos e condições utilizadas para a concentração e troca de tampão da HRPII.

	Método de concentração e troca de tampão	Tamanho do poro da membrana
<b>1ª e 2ª Produção</b>	<i>Diaflo</i>	30 kDa (membrana <i>Millipore</i> )
<b>3ª Produção</b>	Diálise (utilizando CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na, 100 mM, pH 4,8)	12 a 14 kDa (membrana <i>Medicell International Lts</i> )
<b>4ª e 5ª Produção</b>	<i>Centricons (Millipore)</i>	3 kDa

#### 3.2.2.4 - Crescimento de *E. coli* BL21 para produção de HRPII recombinante

A primeira parte deste procedimento foi feita à semelhança do descrito anteriormente para a produção da HRPII, em que ocorreu uma inoculação em meio LBagar e uma primeira inoculação em meio LB.

Adicionaram-se 100 µL do resultante a 2 L de meio LB, divididos em 2 *erlemeyers*, com ampicilina 40 µg/mL, e deixou-se incubar a 37°C e 180 rpm até ser atingida uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. Adicionou-se a um deles IPTG 0,4 mM e a outro IPTG 50 µM. Deixou-se a incubar a 16°C e 180 rpm durante 20 horas.

Recolheram-se amostras a cada 15 minutos durante as primeiras 5 horas após a inoculação, de 30 em 30 minutos nas 2 horas seguintes e a partir deste ponto as amostras foram recolhidas a cada hora, até um total de 22 horas.

#### 3.2.3 - OmpF recombinante de *E. coli*

##### 3.2.3.1 - Extração do plasmídeo *pGOmpF* de células *E. coli* BL21

O plasmídeo encontrava-se no interior de células de *E. coli* BL21 mutadas, desde 2006. Para extrair o plasmídeo foi necessário inocular durante a noite células em meio LB contendo ampicilina numa concentração final de 50 µg/mL, a 37°C e 180 rpm.

Centrifugou-se 18 mL de cultura a 8.000 g durante 2 minutos (a partir deste ponto todo o procedimento foi feito em gelo), desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 150 µL de solução AL1 (50 mM glucose, 10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA pH 8). Após 5 minutos, adicionou-se 300 µL de solução AL2 (0,2 N NaOH, 1% SDS; preparada de fresco) e deixou-se reagir outros 5 minutos após os quais se adicionou 230 µL de solução AL3 (Acetato de potássio 3 M, pH 5).

Deixou-se reagir durante 45 minutos e depois centrifugou-se 20 minutos a 4°C e 18.600 rpm. Ao sobrenadante adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto e deixou-se reagir durante 1 hora a -80°C. Centrifugou-se 10 minutos a 4°C e 18.600 rpm, lavou-se o *pellet* com etanol gelado 70% e centrifugou-se novamente 5 minutos, a 18.600 rpm e 4°C. O *pellet* foi seco num sistema de

vácuo e depois ressuspendido em 200 µL de água Mili-Q autoclavada. Adicionou-se RNase numa proporção de 1:50 e deixou-se reagir durante 1 hora a 37°C.

Adicionou-se 1 volume de fenol e misturou-se por inversão durante 1 minuto. De seguida centrifugou-se 5 minutos a 18.600 rpm e à temperatura ambiente. Retirou-se a fase aquosa, a esta adicionou-se 1 volume de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturou-se por inversão durante 1 minuto. Centrifugou-se 10 minutos a 13.000 rpm, separou-se a fase aquosa, à qual se adicionou 3 volumes de etanol absoluto, e deixou-se reagir durante 1 hora a -80°C.

Centrifugou-se durante 10 minutos, a 18.600 rpm e 4°C e desprezou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com etanol frio 70% e centrifugou-se 5 minutos a 18.600 rpm (este passo foi feito duas vezes). Secou-se num sistema de vácuo 10 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* em 40 µL de água Mili-Q autoclavada. Determinou-se a concentração de DNA utilizando um espectrofotómetro Nanodrop (*Thermo scientific Nanodrop 2000C*).

### 3.2.3.2 - Sequenciação do *pGOMP*

O DNA foi sequenciado com o recurso a *primers* universais para promotor T7, pela empresa STABVIDA, Lda.

O resultado obtido foi comparado com o disponível na base de dados do BLAST (*basic local alignment search tool*).

### 3.2.3.3 - Transformação de células *E. coli* BL21 (DE3) *Omp8* (células competentes e inserção do plasmídeo)

#### Método de choque térmico

O procedimento de transformação das células foi executado com um *stock* de células competentes, armazenado desde 2006 a -80°C.

Para tornar as células competentes adicionaram-se as células a uma placa contendo LBagar e deixou-se incubar durante a noite a 37°C, desta placa retirou-se uma colónia que foi adicionada a meio LB e deixou-se incubar durante a noite a 37°C e 180 rpm. Procedeu-se a uma diluição de 100 vezes em meio LB e deixou-se a incubar nas mesmas condições até ser atingida uma densidade ótica a 600 nm entre 0,25 e 0,3.

Colocou-se a cultura em gelo durante 15 minutos e centrifugou-se durante 10 minutos a 3.300 xg a 4°C. Ressuspendeu-se o *pellet* em CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frio e manteve-se as células em gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se o *pellet* numa solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M e 15% de glicerol frio.

A 20 µL de células competentes adicionou-se aproximadamente 2 µg de plasmídeo e misturou-se. Deixou-se em gelo durante 30 minutos, colocou-se as mesmas durante 40 segundos a 42°C e novamente em gelo durante 2 minutos.

Adicionou-se 80 µL de meio SOC e deixou-se incubar 1 hora, a 37°C e 200 rpm. Adicionou-se 50 µL de células a uma placa com LBagar e ampicilina 40 µg/mL, e deixou-se a incubar durante a noite a 37°C.

#### Método de eletroporação

De forma a tornar as células competentes preparou-se um inoculo em meio LB que foi deixado crescer durante a noite a 37°C e a 180 rpm. As células foram então colocadas em gelo durante 30 minutos e depois centrifugadas durante 10 minutos, a 4.700 xg e a 4°C. O *pellet* foi ressuspendido em um volume de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M gelado e depois centrifugado novamente a 4.000 rpm, durante 10 minutos e a 4°C. Repetiu-se o mesmo procedimento duas vezes mas ressuspendendo o *pellet* em CaCl<sub>2</sub> frio 0,1 M, um volume da primeira vez e 0,3 volumes da



segunda vez. Adicionou-se glicerol 10% e congelaram-se em azoto as células até à sua utilização.

Colocou-se 100 µL de células numa célula (*E. coli pulser*, Bio-Rad, eléctrodo 0,2 cm) e adicionou-se DNA. A célula foi então colocada no eletroporador e foi aplicada corrente. Os parâmetros usados para este processo foram 25 µFD, 200 Ω e 2,5 kV.

Adicionou-se 1 mL de meio SOC e deixou-se incubar a 37°C durante 1h30 em banho-maria. Adicionaram-se 200 µL de células transformadas numa placa contendo LBagar e ampicilina numa concentração de 40 µg/mL e deixou-se incubar durante 16 horas a 37°C.

#### 3.2.3.4 - Transformação de células *E. coli* DH5α

As células de DH5α foram tornadas competentes através do método de eletroporação.

O processo de inserção do plasmídeo *pGOmpF* foi realizado pelo método de choque térmico (anteriormente descrito).

#### 3.2.3.5 - Extração do plasmídeo *pGOmpF* de células *E. coli* DH5α

Esta extração foi efetuada recorrendo a um *kit* de isolamento de DNA plasmídico de elevada pureza (*Roche*) e o protocolo utilizado foi o fornecido<sup>51</sup> pela *Roche*.

Procedeu-se à inoculação de meio LB com *E. coli* e deixou-se incubar durante a noite. Essa cultura foi então centrifugada (6.000 xg, 30 segundos) e o *pellet* ressuscitado em tampão de suspensão (Tris-HCl 50 mM e EDTA 10 mM pH8) com RNase e em tampão de lise (NaOH 0,2M e SDS 1%) e deixou-se incubar 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se tampão de ligação frio (Hidrocloreto de guanidina 4 M e acetato de potássio 0,5M pH 4,2), deixou-se incubar 5 minutos em gelo e centrifugou-se 10 minutos à velocidade máxima.

O sobrenadante foi então transferido para um tubo *High Pure filter* e centrifugou-se 1 minuto à velocidade máxima. Adicionou-se tampão de lavagem (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM pH7,5, em etanol), centrifugou-se um minuto a 13.000 xg, adicionou-se tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH8,5) e centrifugou-se um minuto a 13.000 xg.

#### 3.2.3.6 - Produção de OmpF recombinante

Utilizando um dos *stocks* das células (Tabela 3.3), inoculou-se uma placa de LBagar contendo ampicilina numa concentração final de 40 µg/mL e deixou-se incubar durante a noite.

Uma colónia isolada foi adicionada a meio LB com 40 µg/mL de ampicilina e deixou-se incubar durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 37°C e 180 rpm. Diluiu-se 100 vezes o inóculo em novo meio LB e deixou-se incubar a 37°C e 180 rpm até atingir uma densidade ótica a 600 nm entre 0,75 e 1,1. Neste ponto induziu-se com 0,4 mM de IPTG e deixou-se incubar durante 6 horas. Após este tempo, centrifugou-se a 8000 xg, 4°C durante 20 minutos, os diferentes procedimentos experimentais adotados após centrifugação encontram-se descritos na Tabela 3.3.

Para ressuscitar o *pellet* utilizou-se tampão Tris (20mM, pH8) com 2% SDS, PMFS 50 g/L e DNase 50 µg/mL. Homogeneizou-se (Tabela 3.3) e deixou-se incubar 1 hora e 30 minutos, a 50°C e 150 rpm. Centrifugou-se a 11.000 xg, a 25°C durante 45 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em tampão fosfato 20 mM pH 7, contendo 0,125% o-POE (n-Octylpolyoxyethylene, *Bachem*) e PMSF 50 g/L, homogeneizou-se, incubou-se a 37°C e 150 rpm durante 45 minutos e ultracentrifugou-se (centrífuga *Beckman Couter, Optima LE-80K Ultracentrifuge*, rotor 45 ti) durante 40 minutos, a 219.331 xg. Repetiu-se o passo anterior alterando o tampão para fosfato 20 mM pH7, contendo 3% de o-POE e PMSF 50 g/L e recolheu-se o sobrenadante (proteína).

Utilizando o sistema de *diaflo*, com uma membrana de 30 kDa, procedeu-se à troca de tampão para fosfato 20 mM pH7, contendo 1% de o-POE e também à concentração da proteína.

**Tabela 3.3 Parâmetros testados ao longo das produções de OmpF recombinante**

	<i>Stock de inóculo inicial</i>	<b>Procedimento efetuado após incubação final de 6 horas</b>	<b>Equipamento de homogeneização</b>
<b>1<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Congelou-se o pellet	Homogeneizador
<b>2<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Adicionou-se 100 µL de PMSF (50 g/L) ao <i>pellet</i> e congelou-se	Homogeneizador
<b>3<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Guardaram-se os inóculos a 4°C durante a noite e centrifugaram-se na manhã seguinte	<i>French Press</i>
<b>4<sup>a</sup> Produção</b>	11/2012	Ressuspendeu-se o <i>pellet</i> após a centrifugação e guardou-se a 4°C durante a noite	<i>French Press</i>

### 3.3 - Aplicações de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* à detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção

#### 3.3.1 - Interações anticorpo/antígeno (2E6/Hsp70)

##### 3.3.1.1 - Produção e purificação do anticorpo monoclonal 2E6

Para os ensaios envolvendo a proteína recombinante Hsp70 foi necessária a utilização de um anticorpo apropriado, neste caso foi o anticorpo monoclonal 2E6. A produção deste anticorpo foi feita no Instituto de Medicina Molecular (IMM), pela Doutora Cláudia Cunha.

Segundo a mesma uma cultura de hibridomas foi incubada utilizando condições de produção normais de *scale-up* para 2,6 L de cultura contendo o anticorpo monoclonal.<sup>52</sup>

A precipitação da proteína foi efetuada utilizando uma solução de sulfato de amónia 50% p/v a 4°C. O precipitado foi recolhido através de centrifugação e posteriormente ressuspendido em PBS (tampão fosfato-salino).

De forma a remover o excesso de sais procedeu-se a uma dialise, utilizando uma membrana (*Medicell International*, UK; com poros entre 12 e 14 kDa), fazendo duas trocas do tampão PBS durante a noite e obtendo-se no final cerca de 100 mL de anticorpo impuro.

Antes de se iniciar a purificação do anticorpo, este foi centrifugado a 6000 xg durante 30 minutos de forma a eliminar resíduos sólidos.

Para a purificação foi utilizada uma resina de proteína G *Sepharose*<sup>TM</sup> 4 *Fast Flow* (GE Healthcare) e colunas *Ab SpinTrap*<sup>TM</sup> (GE Healthcare).

##### Procedimento utilizando resina Proteína G *Sepharose*<sup>TM</sup> 4 *Fast Flow*

Antes de se iniciar o processo de purificação procedeu-se a um BCA de forma a determinar a concentração de anticorpo e a quantidade máxima do mesmo a adicionar à coluna, tendo em conta a recomendação do fabricante<sup>53</sup>.

Equilibrou-se a resina com 5 a 10 volumes de tampão de ligação (20mM de tampão de fosfato de sódio pH 7). Seguidamente foi adicionado 1 volume de anticorpo e tampão de ligação até a densidade ótica a 280 nm ser próxima de zero. Neste ponto adicionou-se cerca de 6 volumes de tampão de eluição (glicina-HCl 0,1M pH 2,7) e recolheu-se o eluído para um tubo de ensaio contendo cerca de 0,25 volumes de tampão de neutralização (Tris-HCl 1M pH 9).

Procedimento utilizando *Ab SpinTrap™* (GE Healthcare)<sup>54</sup>

Ressuspendeu-se o meio (etanol 20%) por inversão durante 1 minuto e removeu-se o meio através de centrifugação durante 1 minuto a 100 xg. A coluna foi colocada num tubo *ependorf*.

À coluna, foram adicionados 600 µL de tampão de ligação (fosfato de sódio 20mM, pH 7) e centrifugou-se durante 1 minuto. Seguidamente o anticorpo foi adicionado (aproximadamente 600 µL) e misturou-se por inversão durante 4 minutos, empacotou-se a resina da coluna através de centrifugação durante 1 minuto e procedeu-se à eluição de resíduos centrifugando-se por mais um minuto.

Adicionou-se 600 µL de tampão de ligação, misturou-se por inversão durante 1 minuto e centrifugou-se outro, este procedimento foi realizado duas vezes. À coluna adicionou-se 400 µL de tampão de eluição (Glicina-HCl 0,1M, pH 2,7), misturou-se por inversão por 1 minuto e centrifugou-se outro de forma a recolher o eluído num tubo coletor contendo 30 µL de tampão de neutralização (Tris-HCl 1M, pH 9). Este último passo foi efetuado duas vezes.

#### Concentração e troca do tampão

Após a purificação do anticorpo procedeu-se à concentração do mesmo assim como à troca da mistura de tampões (neutralização e eluição) para tampão Fosfato de sódio 20 mM pH 7 utilizando um sistema *centricon* (*Milipore*) com uma membrana 3 kDa centrifugando por períodos de 5 minutos a 7500 xg.

#### 3.3.1.2 - Síntese de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6 (BSA))

A uma solução de AuNP de concentração 2,5 nM adicionou-se MUA (ácido mercaptoundecanóico) numa proporção de 1 AuNP para 5000 MUA. A estes conjugados adicionou-se 2E6 numa proporção de 1 para 25 e deixou-se a incubar durante a noite a 4°C.

Os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) foram centrifugados a 20.817 xg durante 60 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi ressuscitado numa solução de BSA 10 mg/mL e incubado durante 1 hora no escuro, à temperatura ambiente. Centrifugaram-se novamente os bionanoconjugados a 20.817 xg, por 30 minutos, a 4°C e ressuspendeu-se o *pellet* em tampão fosfato de sódio, pH 7 num volume 13 vezes inferior ao inicial ( $\approx$  33 nM de concentração final). Este passo foi executado duas vezes.

#### 3.3.1.3 - Estabilidade de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6 (BSA)) ao longo do tempo, com a variação do pH do meio e com a variação da força iónica

Os conjugados anteriormente descritos foram avaliados por espectrometria de UV-Visível num intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm. E procedendo ao quociente entre os valores de absorvância a 600 nm (forma agregada da partículas) e a 525 nm (forma não agregada das partículas). Variou-se os valores pH pela adição de HCl ou de NaOH, e a força iónica foi testada adicionando diferentes quantidades de NaCl, mantendo a concentração final de AuNP constante.

#### 3.3.1.4 - Ensaio de ELISA

Durante um ensaio de ELISA a lavagem, da placa (*Nunc® MaxiSorp™ 384 well plates, Sigma-Aldrich*) foi sempre efetuada utilizando uma vez PBS-T (tampão PBS com 0,05% de *tween-20*) e duas vezes com PBS.

A cada poço da placa de ELISA adicionou-se o antígeno (Hsp70) diluído em tampão carbonato e adicionou-se o restante volume de tampão carbonato. Deixou-se incubar durante a noite a 4°C.

Lavou-se a placa e adicionou-se a cada poço uma solução de BSA a 2%, deixou-se incubar duas horas à temperatura ambiente e procedeu-se novamente à lavagem da placa.

Adicionou-se os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) ou anticorpos (2E6) e deixou-se incubar à temperatura ambiente, o tempo de incubação neste passo foi testado, experimentando-

se 15 minutos, 1 hora, 2 horas e durante a noite. Procedeu-se à lavagem da placa e fez-se uma leitura a 280 e a 525 nm.

Adicionou-se o anti-IgG de rato diluído 2500 vezes e deixou-se incubar durante uma hora à temperatura ambiente.

Lavou-se a placa e adicionou-se o OPD (*o-Phenylenediamine*) preparado de fresco. Passados 30 minutos desta adição fez-se uma leitura a 450 nm.

### 3.3.1.5 - Ensaio de fluorescência

Para esta técnica foram utilizados vários protocolos experimentais, de forma a otimizar o ensaio fluorimétrico. Os protocolos realizados encontram-se descritos seguidamente.

Todos os espectros foram efetuados utilizando um espectrofluorímetro (LS45, *Perkin Elmer*), num comprimento de onda de emissão entre 500 e 700 nm e com um comprimento de onda de excitação de 480 nm.

#### Conjugados Hsp70-Cy3B<sup>27</sup>

Misturaram-se 300 µL de Hsp70 (3,8 mg/mL) e 7 µL Cy3B (5 mg/mL), valores correspondentes a uma razão molar de 1:3 (1 Hsp70 para 3 Cy3B) e deixou-se incubar durante 2h30, à temperatura ambiente e ao escuro.

Procedeu-se à lavagem do excesso de Cy3B com PBS e utilizando um sistema *centricon* de 3 kDa, com ciclos de 10 minutos a 7500 xg e traçando espectros de UV-Visível das lavagens até ser obtido um máximo de absorvância entre 500 e 800 nm inferior a 0,05.

Concentram-se os conjugados para um volume final de 500 µL (2,3 mg/mL de Hsp70), sendo as alíquotas armazenadas no escuro, a -20°C.

#### Estudo da estabilidade:

##### Estabilidade dos conjugados Hsp70-Cy3B

Fez-se uma mistura com 1 volume de Hsp70-Cy3B para 2 de PBS e traçou-se o espectro de emissão a cada 25 minutos.

##### Estabilidade da mistura AuNP-MUA-2E6 e Hsp70-Cy3B

Misturaram-se Hsp70-Cy3B, AuNP-MUA-2E6 e PBS em volumes iguais e traçou-se o espectro de emissão a cada 25 minutos.

##### Estabilidade da mistura AuNP-MUA-2E6, Hsp70-Cy3B e Hsp70

Misturaram-se Hsp70-Cy3B, AuNP-MUA-2E6 e Hsp70 (1,12 mg/mL) em volumes iguais e traçou-se o espectro de emissão a cada 25 minutos.

#### Procedimentos efetuados:

##### Procedimento 1

Inicialmente tentou-se reproduzir os resultados obtidos por Guirgis *et al*<sup>27</sup>.

De uma forma breve, prepararam-se os bionanoconjugados e os conjugados de Hsp70-Cy3B.

Misturaram-se 20 µL de AuNP-MUA-2E6, 20 µL de Hsp70-Cy3B e quantidades variáveis de Hsp70 e PBS para um volume total de 60 µL. Deixaram-se reagir durante 3 horas ao escuro, à temperatura ambiente e efetuou-se o espectro de emissão após esse tempo.

## Procedimento 2

Este procedimento foi semelhante ao procedimento 1 alterando-se apenas a razão entre AuNP e MUA nos Bionanoconjugados, aumentando-a de 1:120 para 1:5000.

A razão desta alteração prende-se por se ter chegado à conclusão, em estudos anteriores, que a razão 1:120 não recobria completamente as partículas.

## Procedimento 3

Misturam-se em partes iguais os Bionanoconjugados e a Hsp70-Cy3B, traçou-se o espectro de emissão, esperou-se 20 minutos voltou-se a traçar o espectro de emissão. Adicionou-se Hsp70, em quantidades previamente estabelecidas, e traçou-se um espectro de emissão logo após a adição e após 20 minutos de reação.

## Preparação das culturas de sangue humano:

### Extratos de saponina (amostras infetadas e não infetadas)

De acordo com a doutora Cláudia Cunha e Sá, IMM, Portugal, as amostras foram preparadas pela separação das hemácias, através do gradiente de Ficoll, de uma colheita de sangue fresca de um dador saudável.

Começou-se com uma cultura de *P. falciparum* 3D7 através da adição de hemácias infetadas às saudáveis e deixou-se incubar em meio rico, até se atingir um nível de parasitémia de 4%.

As hemácias foram então separadas por centrifugação (800 xg, 5 minutos, 4°C), o pellet foi lavado com PBS e procedeu-se à lise utilizando saponina (0,15% em PBS).

### Procedimento com amostras infetadas e não infetadas

Repetiram-se os procedimentos de 2 e 3 mas utilizando as amostras obtidas através dos extratos de saponina.

## Tratamento dos dados:

**Retas de calibração:** para o cálculo da intensidade de fluorescência relativa utilizou-se a Equação 3.2, sendo que o branco corresponde à intensidade de fluorescência a 574 nm da mistura de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) e antigénio marcado (Hsp70-Cy3B).

### Equação 3.2

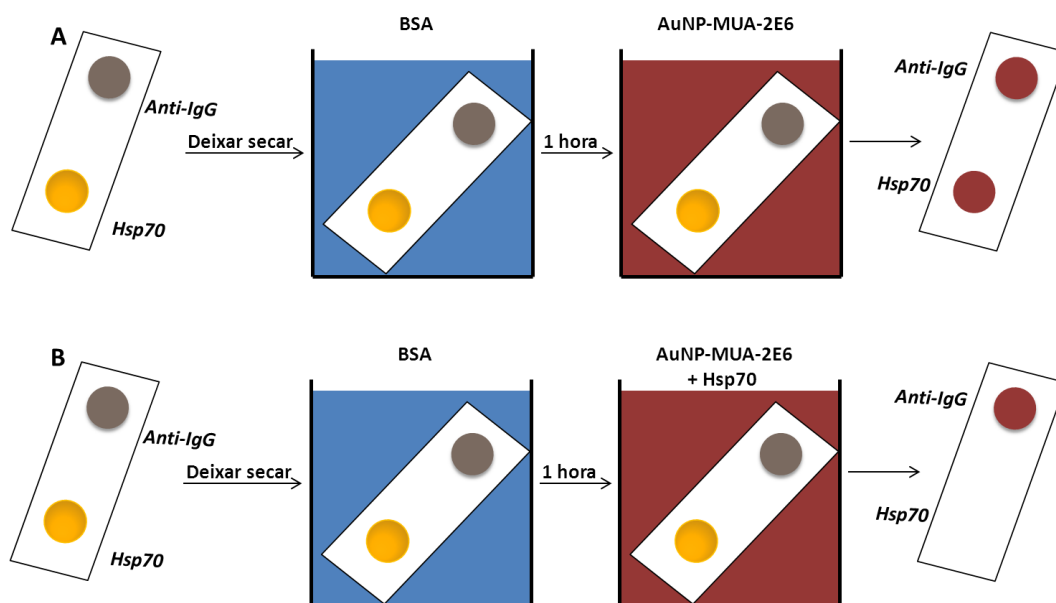
$$IF(\%) = \left(1 - \frac{IF(574\text{ nm})_{\text{branco}}}{IF(574\text{ nm})_{\text{amostra}}}\right) \times 100$$

**Amostras:** o cálculo é feito de forma semelhante às retas de calibração (Equação 3.2), sendo o branco neste a mistura dos bionanoconjugados, do antigénio marcado e de cultura não infetada.

### 3.3.1.6 - Ensaios imunocromatográficos (em tiras de nitrocelulose)

Numa tira de nitrocelulose colocou-se 20 µL de anti-IgG diluído 5 vezes, numa extremidade e na outra 13 µg de Hsp70 e deixou-se imobilizar durante 1 hora ou durante toda a noite. Mergulhou-se a tira numa solução de BSA 10 mg/mL e deixou-se incubar 1 hora à temperatura ambiente. De seguida a tira foi mergulhada nos bionanoconjugados, AuNP-MUA-2E6, (com uma concentração de ouro de aproximadamente 10 nM), para o resultado negativo, ou em AuNP-MUA-2E6 misturado previamente com Hsp70 (em diferentes quantidades), para o resultado positivo.

O procedimento utilizado nestes ensaios encontra-se esquematizado na Figura 3.1.



**Figura 3.1** Esquema do procedimento utilizado para as tiras de nitrocelulose. A - Resultado negativo B - Resultado positivo

### 3.3.2 - Interações anticorpo/antígeno (2G12/HRPII)

#### 3.3.2.1 - Síntese de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12 (BSA))

Para a obtenção destes conjugados utilizou-se o mesmo procedimento acima descrito para os bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 (BSA), apenas substituindo o anticorpo monoclonal 2E6 (anti-Hsp70) pelo anticorpo monoclonal designado por 2G12 (antiHRPII), que foi produzido pelo grupo de investigação colaborador, liderado pela Professora Doutora Diane Taylor (Universidade do Hawaii, E.U.A). Um anticorpo monoclonal anti HRPII também foi adquirido comercialmente em *antibodies-online.com*.

#### 3.3.2.2 - Ensaio Western-Blot

Efetuuou-se a técnica de SDS-PAGE, de acordo com o descrito anteriormente, exceto que a corrente aplicada foi de 180 V e os marcadores utilizados foram os da Biorad (#161-0377))

As proteínas separadas pela técnica SDS-PAGE foram transferidas para as membranas de nitrocelulose (Figura 2.18), foram mergulhadas em tampão de transferência (1,92 M glicina, 0,25 M Tris, 1% p/v SDS e 20% v/v de etanol), e foi aplicado um campo elétrico de 300 mA durante 1 hora.

Procedeu-se à lavagem com PBS-T e PBS e ao bloqueamento com leite em pó 5% p/v durante uma hora, a 4°C e 18 rpm. Lavou-se com PBS-T e PBS, a uma das membranas adicionou-se o anticorpo primário (2G12, 4,4 µg/mL) e à outra membrana os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12). Deixou-se reagir durante a noite a membrana com os bionanoconjugados e durante 1h40 ou durante a noite a membrana com o anticorpo.

A membrana com os bionanoconjugados foi lavada com PBS-T e PBS. A outra membrana também foi lavada, adicionou-se o anticorpo secundário, anti-IgG-HRP (diluído 5000 vezes em leite 5% p/v) e deixou-se incubar 1 hora e 40 minutos.

Após esse tempo a membrana foi lavada e adicionou-se *SuperSignalWestPico Chemiluminescent substrate* (ThermoScientific) de forma a cobrir a membrana durante 3 minutos. Por último a membrana foi revelada por raio-X utilizando uma hipercassete reveladora (*fujifilm*).

## 4 - Resultados e discussão

### 4.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes

#### 4.1.1 - Hsp70 recombinante de *Plasmodium falciparum*, produção e purificação

A Hsp70 utilizada no presente trabalho é uma das proteínas produzidas pelo *Plasmodium falciparum*, um dos parasitas responsáveis pela malária e possui um papel muito importante na adaptação do parasita ao hospedeiro, tendo vindo a ser estudada a sua utilização em vacinas e em testes de deteção de malária como é o caso deste trabalho.<sup>4,27</sup>

Com o intuito de produzir esta proteína laboratorialmente foi inserido o plasmídeo, cedido amavelmente pelo Doutor Tonderayi Matambo (Rhodes University, Africa do Sul), num sistema de sobreexpressão de células *E. coli Rosetta Blue*<sup>TM</sup> pelo Doutor Gonçalo Doria e pelo Mestre Bassem Guirgis (ambos a trabalhar na altura na FCT/UNL).

De forma a avaliar a e a pureza e a concentração da proteína obtida no final de cada produção e purificação, utilizaram-se os métodos de BCA e de SDS-PAGE. A proteína Hsp70 de *Plasmodium falciparum* que apresentou, tal como o esperado, um peso molecular de aproximadamente 70 kDa em todas as produções e purificações (Anexo 7.1.2 - Hsp70 recombinante de *Plasmodium falciparum*)

A produção, desta proteína, foi otimizada em trabalhos anteriores<sup>50,55</sup>, pelo que o protocolo utilizado não sofreu grandes alterações. As alterações que foram efetuadas e os resultados que foram obtidos ao longo das várias produções encontram-se resumidos na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 Resultados obtidos durante a produção e purificação de Hsp70 recombinante.**

	Diluição do pré-inoculo	Quantidade de proteína obtida antes de concentração e troca de tampão (mg)	Método de concentração e de troca de tampão	Quantidade final de proteína Hsp70 pura (mg)	Perda durante o processo de concentração e lavagem (%)
<b>1ª Produção</b>	1:50	33,61	<i>Diaflo</i>	33,51	0,3
<b>2ª Produção</b>	1:100	---	<i>Diaflo</i>	9,86	---
<b>3ª Produção</b>	1:100	7,78	<i>Diaflo</i>	3,21	41,1
<b>4ª Produção</b>	1:1000/1:25	---	<i>Centricon (3 kDa)</i>	15	---

Pela análise da Tabela 4.1 conclui-se que os melhores resultados são os provenientes do uso de uma diluição de pré-inoculo de 1:50 utilizado na 1ª produção, uma vez que comparativamente com as restantes produções e purificações foi nesta que se obteve uma maior quantidade final de proteína (33,51 mg) e uma menor perda da mesma durante o processo de concentração e troca de tampão (0,3%).

Na 3ª produção, observou-se que além da quantidade de proteína produzida ser inferior às anteriores, o método de concentração e troca de tampão foi ineficiente, ocorreu uma grande perda de proteína (41,1%) e a proteína final aparentava estar desnaturada. Essa perda de proteína pode ser atribuída ao facto de a membrana utilizada no sistema de *diaflo* já ser antiga e

poder ter uma fuga. Por este motivo na produção seguinte foi utilizado um método de concentração e troca de tampão diferente dos anteriores, através do uso de um sistema de ultrafiltração *centricon* (Millipore) com uma membrana de 3 kDa.

Na 4ª purificação realizou-se uma diluição de pré-inóculo mais elevada comparativamente com o usado nas restantes purificações. Ao fim de 5 horas verificou-se que não existiam alterações no valor da densidade ótica a 600 nm, o que conduziu à adição de mais pré-inóculo obtendo-se uma diluição de 1:25. Devido a este facto o tempo de incubação após indução foi menor do que o habitual (9 horas em vez das 16 horas), o que poderá ter conduzido a uma menor quantidade de proteína produzida.

No final destas produções conclui-se que para maximizar a quantidade de Hsp70 obtida com o sistema descrito para a sua produção e purificação, a diluição de pré-inóculo a utilizar deve ser a de 1:50, e o tempo de incubação após indução não deve ser inferior às 16 horas.

#### **4.1.2 - HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum***

A HRPII (*histidine rich protein* de *Plasmodium falciparum*) é neste momento o antígeno mais utilizado para a deteção de malária, pois encontra-se em concentrações elevadas no plasma sanguíneo. No presente trabalho pretende-se encontrar novas formas de deteção da pfHRPII para uma maior eficácia no diagnóstico de malária.

Para a produção laboratorial desta proteína o plasmídeo, amavelmente cedido Professor Doutor Daniel Goldberg (Washington University, E.U.A.), contendo a sequência genética para a produção desta proteína, foi inserido num sistema de sobre-expressão de células de *E. coli* (DE3) BL21 pela Doutora Inês Gomes (FCT-UNL).

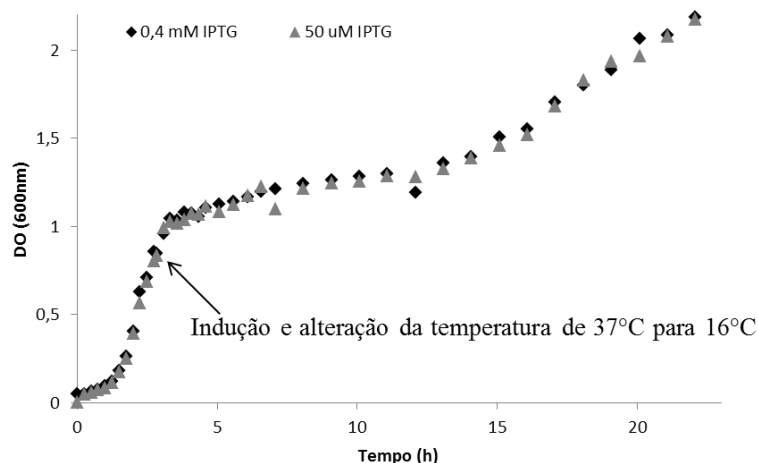
##### **4.1.2.1 - Crescimento de *E. coli* BL21 para produção de HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum***

De forma a determinar a concentração de IPTG mais adequada à produção de pfHRPII recombinante efetuou-se uma medição da densidade ótica a 600 nm ao longo de 22 horas de duas culturas de *E. coli* (DE3) BL21, induzindo uma com a quantidade de 400 µM IPTG indicada por Ndonwi *et al*<sup>7</sup> (num artigo produzido no laboratório do Professor Doutor Daniel Goldberg, que nos forneceu o plasmídeo para expressão da proteína) e a outra com uma quantidade de IPTG cerca de 10 vezes menor (50µM).

Através da curva de crescimento (Figura 4.1) é possível observar que não existem variações significativas ao nível da densidade ótica entre as duas culturas, o que indica que uma concentração de IPTG mais baixa não prejudica o crescimento celular e acarreta a vantagem de se utilizar um menor quantidade de um composto tóxico. Resta determinar se esta concentração menor de IPTG permite uma indução de expressão a níveis semelhantes à concentração elevada.

Ainda é possível verificar que a fase exponencial do crescimento ocorre entre as 0,5 horas e as 4 horas, iniciando-se às 4 horas, começando neste ponto o que parece ser a fase estacionária que deveria ser seguida de uma fase de morte celular. No entanto por volta das 12 horas inicia-se uma nova fase exponencial menos acentuada que a primeira (possui um menor declive).





**Figura 4.1** Curva de crescimento de *E. coli* (DE3) BI21 para a produção de HRPII recombinante.

Esta segunda fase exponencial é típica de crescimentos bacterianos em meios de cultura onde existem diferentes tipos de açúcar, uns menos complexos que serão consumidos na primeira fase exponencial e outros mais complexos que serão consumidos numa nova fase exponencial.

Neste caso existe apenas um tipo de açúcar disponível, logo só deveria haver uma fase exponencial. O aparecimento de uma segunda fase exponencial pode ser indicativa que as bactérias estarão a excretar uma substância que será consumida pelas mesmas. Esta substância poderá ser ou não a HRPII recombinante, se for HRPII recombinante é uma justificação para os baixos rendimentos das produções, assim como da instabilidade da mesma.

Uma forma de impedir que tal aconteça será parar o crescimento ao fim de 10 horas após a indução, evitando assim a segunda fase exponencial.

No entanto tendo em conta que após a indução as culturas são mantidas a uma temperatura muito mais baixa do que até ali (a temperatura diminuiu de 37 para 16°C) é possível que esta baixa de temperatura seja responsável pela diminuição na velocidade de crescimento, levando assim a uma falsa fase estacionária. Após algum tempo o sistema adapta-se às novas condições ambientais (à nova temperatura) e consegue aumentar a velocidade de crescimento, parecendo assim ocorrer uma nova fase exponencial, quando na verdade esta será apenas uma continuação da anterior. Desta forma pode-se verificar (através da Figura 4.1) que o crescimento não entrou na fase estacionária quando o processo é parado e por este motivo poder-se-á testar aumentar o tempo de incubação para além das 20 horas após indução numa tentativa de aumentar a quantidade de proteína produzida.

#### 4.1.2.2 - Produção e purificação de HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum*

Neste processo todas as concentrações de proteína foram determinadas utilizando o método de BCA e a massa molecular foi determinada a partir dos géis obtidos pela técnica SDS-PAGE. Assim os pesos moleculares obtidos podem diferir em cerca de 10% em relação aos esperados, dadas as limitações inerentes a esta técnica para determinação de pesos moleculares<sup>7</sup>.

Os resultados obtidos durante as diferentes produções e purificações são resumidamente apresentados na Tabela 4.2. A Figura 4.2 ilustra o gel SDS-PAGE das diferentes amostras recolhidas ao longo do processo de produção e purificação da HRPII recombinante, que mostra uma banda intensa por volta dos 35 kDa nas amostras entre o processo de centrifugação após o crescimento celular e o processo de purificação, e no qual não é possível distinguir uma banda correspondente à proteína objetivo (a HRPII) até ao final de todo o processo de produção e purificação, pois não está a ser expressa a níveis superiores em relação a outras proteínas presentes nas células.

Tabela 4.2 Parâmetros testados e resultados obtidos durante a produção e purificação de HRPII recombinante.

	Volume inóculo (L)	DO (600 nm) para indução	IPTG (mM)	Temperatura após indução (°C)	Tempo de incubação após indução (h)	Quantidade de proteína HRPII pura antes do processo de concentração e troca de tampão (mg)	Método de concentração e troca de tampão	Quantidade de HRPII pura final (mg)	Perda (%)
1ª Produção	2	0,6	0,4	25	16	2,5	<i>Diaflo</i> (30 kDa)	0,5	80
2ª Produção	4	0,6	0,4	25	16	26,04	<i>Diaflo</i> (30 kDa)	5,4	79
3ª Produção	4	0,6	0,4	25	16	--	Diálise	--	--
4ª Produção	4	0,8	0,05	16	20	3,56	<i>Centricon</i> (3kDa)	1,1	69
5ª Produção	4	0,8	0,05	16	20	--	<i>Centricon</i> (3kDa)	3,82	--

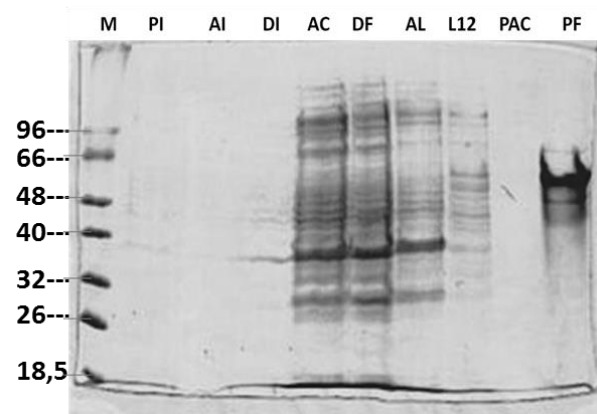
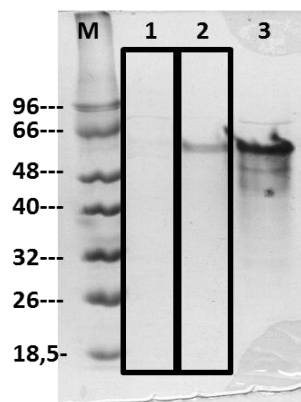


Figura 4.2 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15). M – marcador pesos moleculares (kDa); PI – alíquota pré-inóculo; AI – alíquota antes indução; DI – alíquota após indução; AC – alíquota após centrifugação; DF – alíquota após *French Press*; AL – eluído antes de adição de tampão de lavagem; L12 – Eluído com tampão de lavagem; PAC – HRPII antes de concentração e troca de tampão; PF – HRPII após concentração.

Em quase todas as purificações a proteína obtida apresentou o peso molecular esperado, aproximadamente 50 kDa, e não apresentou contaminantes, que impossibilitassem a sua utilização posterior, como é possível observar na Figura 4.3, na Figura 4.7, na Figura 7.16 e na Figura 7.20.

A proteína resultante da 2ª produção aparentou ser instável, uma vez que passadas 2 semanas da produção e purificação da mesma, esta deixou de estar em solução num dos dois *stocks* obtidos (*stock* 1, Figura 4.3) e no *stock* 2 aparentava uma concentração mais baixa do que tinha após a produção (*stock* 2, Figura 4.3).



**Figura 4.3** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:2). 1 - HRPII recombinante (2ª produção, stock 1); 2 – HRPII recombinante (2ª Produção, stock 2); 3 – HRPII recombinante (1ª Produção)

De forma a confirmar os dados obtidos através da técnica de SDS-PAGE efetuou-se uma quantificação da proteína em solução através do método de BCA. Esta quantificação confirmou que a concentração de proteína tinha diminuído de uma forma significativa, como se pode observar na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Valores de concentração dos 2 *stocks* da 2ª produção (Figura 7.24)

	Concentração após purificação (mg/mL)	Concentração após 2 semanas da produção e purificação (mg/mL)
<b>Stock 1</b>	0,39	0,006
<b>Stock 2</b>	0,36	0,017

De forma a se confirmar se a proteína tinha aderido às paredes do *eppendorf*, onde se encontrava armazenada, adicionou-se 1 mL de solução de BCA ao mesmo e verificou-se o aparecimento de uma cor azul, indicativa da presença de proteína. Desta forma concluiu-se que a proteína tinha aderido às paredes do *eppendorf*.

Nas duas primeiras produções utilizou-se um sistema de *diaflo*, com o intuito de concentrar a proteína e efetuar a mudança de tampão de eluição para tampão TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4), e verificou-se existir grandes perdas de proteína.

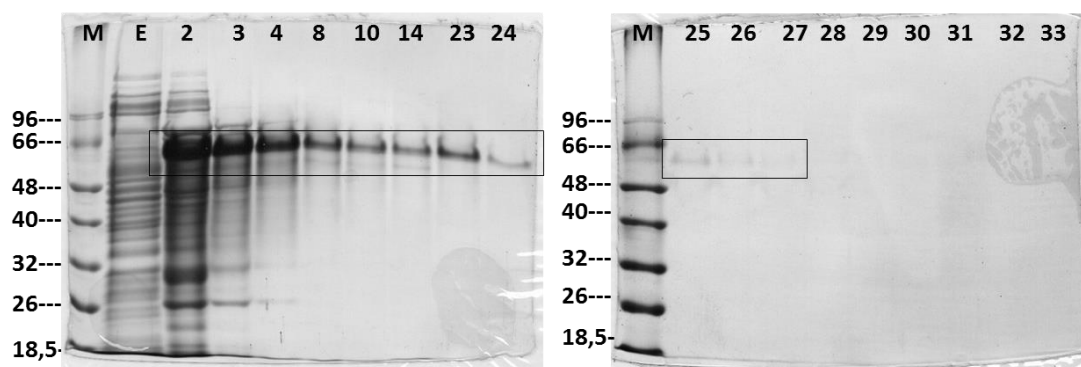
Na primeira vez, em que este processo foi utilizado, ocorreram problemas com o sistema de *diaflo* (aparentemente a membrana possuía uma fuga e a proteína saiu do sistema sob pressão), daí ter-se utilizado o mesmo na 2ª produção, de forma a confirmar se a perda de proteína se devia aos problemas que ocorreram ou se eram inerentes à técnica. Chegou-se à conclusão que os problemas eram inerentes à técnica, pois não ocorreu nenhum tipo de anomalia durante a mesma e a percentagem de perda de proteína foi praticamente a mesma.

Assim sendo concluiu-se que este não seria o melhor método para a concentração e lavagem da proteína (troca de tampão de eluição para tampão TBS).

De forma a ultrapassar este problema realizou-se uma diálise para efetuar a troca de tampão na 3ª produção.

Após a primeira muda de tampão verificou-se a existência de precipitados no interior da membrana de diálise. O processo foi interrompido e tentou-se, sem sucesso, ressuspender o precipitado através de métodos mecânicos e através da adição crescente de detergente (Triton X-100) até uma percentagem de 10% v/v. Nesta produção toda a proteína foi perdida neste passo, e conclui-se que o processo de diálise, nestas condições, não seria o adequado.

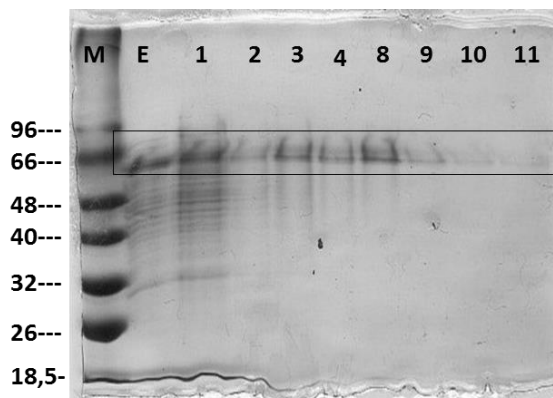
Ainda durante a 3ª produção verificou-se que durante o processo de purificação, quando se procedeu à adição do tampão de eluição, a densidade ótica a 280 nm manteve-se sempre muito próxima de 0,1, o que é indicativo de uma quantidade muito reduzida de proteína. De forma a verificar se a proteína estaria a ser eluída durante a lavagem ou se a produção da proteína havia sido mal sucedida efetuaram-se géis de SDS-PAGE das diversas frações eluídas durante a lavagem e durante a eluição. (Figura 4.4).



**Figura 4.4** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:2). M – marcador de peso molecular (kDa); E – eluído antes da adição de tampão de lavagem; 2 a 14 – frações eluídas com tampão de lavagem; 23 a 33 – frações eluídas com tampão de eluição.

Observando a Figura 4.4 verifica-se que a proteína foi eluída maioritariamente durante a adição do tampão de lavagem (frações 2 a 24) e nas primeiras frações com o tampão de eluição (25 a 27).

De forma a verificar se a eluição antecipada da proteína ocorreu devido a um problema com a resina de níquel-NTA (regenerada após anteriores purificações), repetiu-se o processo de purificação utilizando uma resina de níquel-NTA nova. Mais uma vez foi possível verificar que a maioria da proteína foi eluída durante a lavagem. (Figura 4.5)

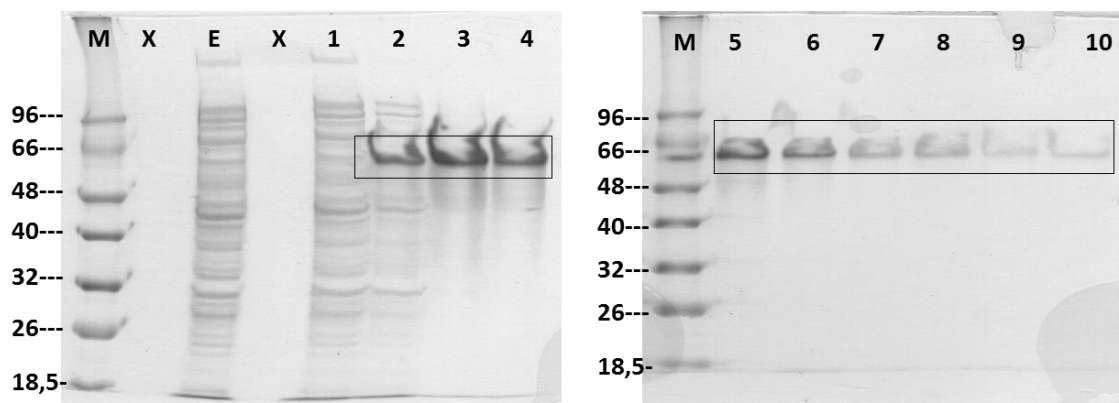


**Figura 4.5** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h20, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1 a 4 – frações eluídas com tampão de lavagem; 8 e 11 – frações eluídas com tampão de eluição.

Como nas frações de 2 a 11 a proteína apresentava uma pureza satisfatória decidiu-se utilizar as mesmas, e realizar o processo de diálise como anteriormente descrito.

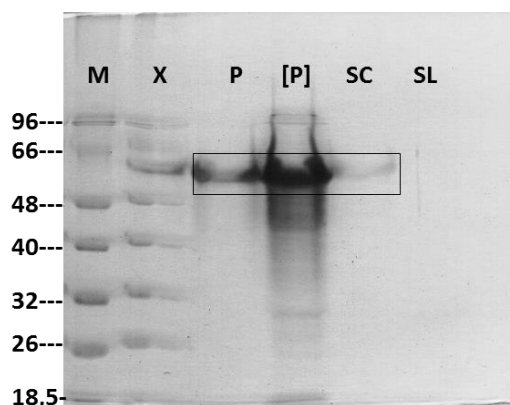
Como o processo de produção e de purificação não estava a ser bem-sucedido pois a proteína obtida era instável foram alterados alguns parâmetros (Tabela 4.2, 4ª produção) nomeadamente a densidade ótica a 600 nm para a indução e a temperatura e o tempo após indução, estes por indicação de um colaborador do Professor Doutor Daniel Goldberg (Universidade de Washington, E.U.A.), o laboratório que nos forneceu o plasmídeo de expressão. A concentração de IPTG também foi alterada a partir dos resultados obtidos durante a curva de crescimento de *E. coli* BL21 para produção de HRPII recombinante, como apresentado na Figura 4.1.

Alterando todos os parâmetros acima referidos obteve-se uma quantidade final de proteína próxima da obtida na 1ª produção (com metade do inóculo inicial), e aquando da purificação verificou-se existir o problema anteriormente descrito, isto é, a proteína foi eluída durante o processo de lavagem. (Figura 4.6)



**Figura 4.6** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); E- eluído antes da adição de tampão de lavagem; 1 a 6 – frações eluídas com tampão de lavagem; 8 a 10 – frações eluídas com tampão de eluição.

Para o processo de concentração e de troca de tampão de lavagem para tampão TBS (das frações de 3 a 10, que se encontravam puras), de forma a evitar as perdas anteriormente descritas, utilizou-se um sistema *centricon* com uma membrana de 3 kDa. Este processo levou a uma perda de proteína ligeiramente menor, passando de 80% para 70%. De forma a verificar a percentagem de perda de proteína utilizou-se o método de BCA.



**Figura 4.7** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); P- proteína antes de concentração; [P] – proteína após concentração e troca de tampão; SC – eluído durante o processo de concentração; SL – eluído durante o processo de troca de tampão.

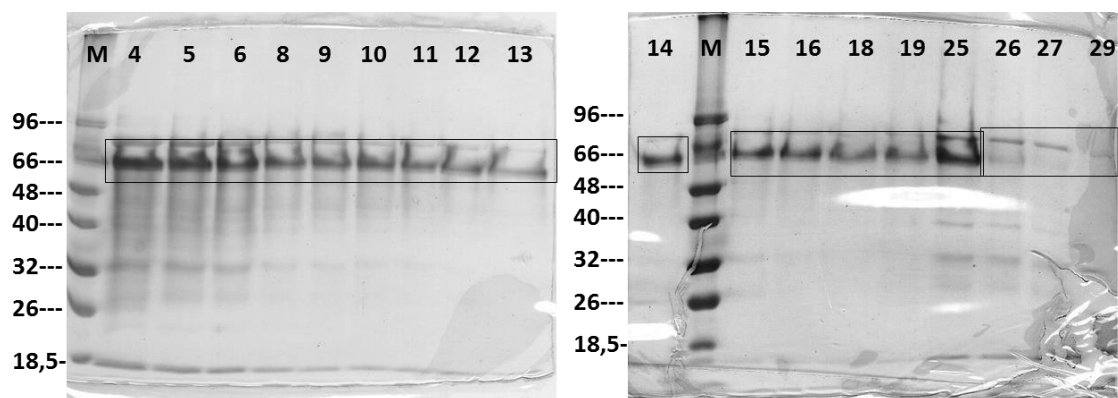
**Tabela 4.4 Resultados obtidos através do método de BCA para as concentrações das frações em estudo.**

	Proteína antes de concentração	Proteína após concentração	Eluído proveniente do processo concentração	Eluído proveniente do processo de troca de tampão
<b>Concentração (mg/mL)</b>	0,089	0,276	0,037	0,061
<b>Quantidade (mg)</b>	3,56	1,1	1,32	0,74

Pela observação da Figura 4.7 verifica-se que a proteína foi perdida durante o processo de concentração, o que foi confirmado pela observação dos resultados obtidos pelo método de BCA (Tabela 4.4).

Para a 5ª produção os parâmetros utilizados foram os mesmos da 4ª produção, com exceção da quantidade de resina de níquel-NTA utilizada para a purificação que aumentou de 5 mL para 15 mL, aumentando a capacidade de ligação (a capacidade de ligação desta resina é de 50 mg/mL<sup>56</sup>) numa tentativa de aumentar o número de locais de ligação da proteína à resina, para que a proteína só fosse eluída durante a adição de tampão de eluição.

No entanto, mais uma vez a proteína foi maioritariamente eluída durante a adição de tampão de lavagem, como se pode verificar na Figura 4.8 (frações 1 a 19). De forma a resolver este problema de futuro dever-se-á testar diferentes concentrações de Imidazole nos tampões de lavagem e de eluição a utilizar durante o processo de purificação.



**Figura 4.8 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 4 a 19 – frações eluídas com tampão de lavagem; 25 a 29 – frações eluídas com tampão de eluição.**

#### 4.1.3 - OmpF recombinante de *E. coli*

A OmpF é uma proteína trans-membranar e uma das principais vias de translocação de antibióticos da família  $\beta$ -Lactam e quinonas para o interior de células de bactérias *E.coli*<sup>13</sup>. Além da OmpF as células de *E.coli* produzem outras proteínas desta família como a OmpA, a OmpB, a OmpC e a OmpR.

De forma a expressar em maiores quantidades a proteína OmpF e tentar eliminar a produção de outras proteínas da mesma família, facilitando assim o processo de produção e de purificação, foi necessário utilizar uma estirpe de *E. coli* (DE3) BL21 com uma deleção dos genes LamB, OmpA e OmpC e uma inserção de Tn5 no gene OmpF, de forma a conferir resistência ao antibiótico. Assim o sistema de sobreexpressão escolhido foram as células de *E. coli* (DE3) BL21 Omp8.<sup>57</sup>

#### 4.1.3.1 - Extração do plasmídeo *pGOmpF* de células *E. coli* BL21

Os principais resultados obtidos após a extração de DNA, a partir das células de *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 transformadas anteriormente em 2006, encontram-se representados na Tabela 4.5.

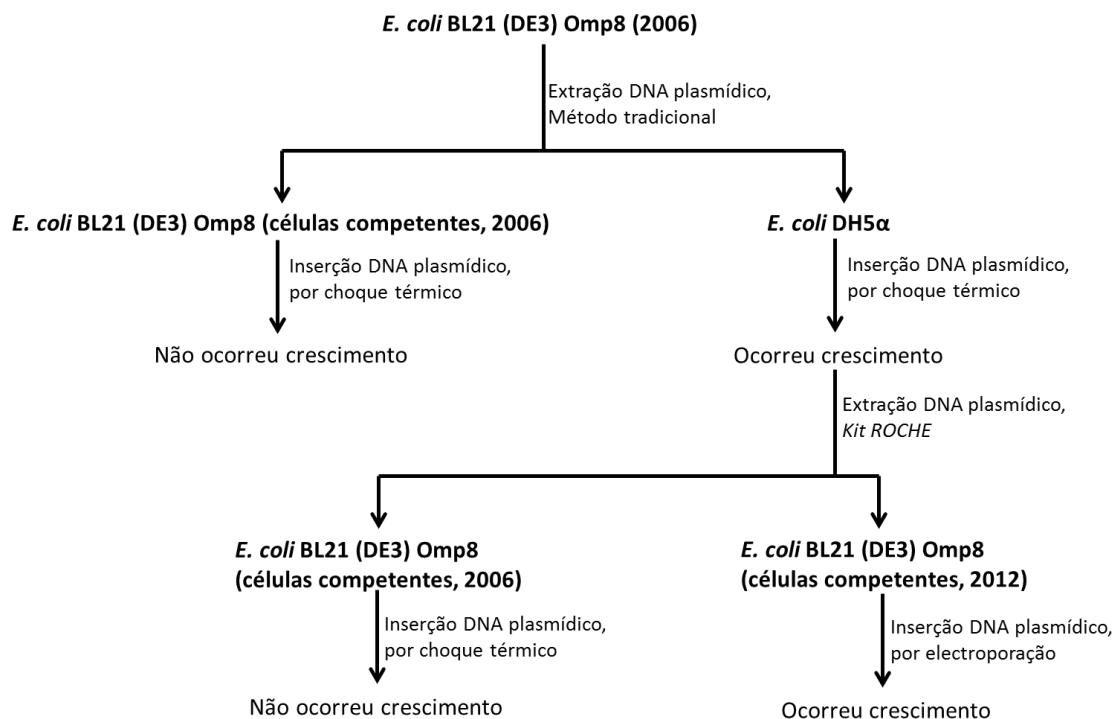
**Tabela 4.5** Parâmetros obtidos após a extração de DNA plasmídeo.

	Valores obtidos	Intervalo Literatura <sup>58</sup>
<b>Abs260/Abs280</b>	1,95	1,8 – 2
<b>Abs260/Abs230</b>	2,62	>1,5
<b>DNA (mg/mL)</b>	1,13	-----

O quociente entre a absorvância a 260 nm e a absorvância a 280 nm, que funciona como indicador de contaminação por outras proteínas, encontra-se dentro dos valores esperados, assim como o quociente entre a absorvância a 260 nm e a absorvância a 230 nm, que funciona como indicador de contaminação por compostos orgânicos e alguns sais. Estes resultados indicam que o DNA possui pureza suficiente e pode ser utilizado para a transformação de células de *E. coli*.

#### 4.1.3.2 - Transformação de células *E. coli* BL21 (DE3) Omp8

A Figura 4.9 apresenta o resumo das técnicas utilizadas e dos principais resultados obtidos, aquando da transformação das células de *E. coli* para a produção da OmpF recombinante.



**Figura 4.9** Esquema ilustrativo dos *stocks* de DNA e das técnicas utilizadas para transformação e dos principais resultados obtidos.

Inicialmente utilizou-se o método de choque térmico e o DNA obtido na extração das células transformadas em 2006, assim como células competentes *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 de 2006. No entanto não ocorreram resultados positivos, ou seja não houve crescimento de células nas placas de LBagar após a transformação.

De seguida procedeu-se à inserção do DNA em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  de forma a tentar perceber se o problema seria das células ou do DNA. Esta transformação foi efetuada através do método de choque térmico e ocorreu crescimento de células nas placas de LBagar.

Estas células foram congeladas em azoto líquido até à sua posterior utilização.

Utilizando o *kit* de isolamento de DNA plasmídico de elevada pureza da *Roche* procedeu-se à extração do DNA plasmídico das células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Tentou-se então, sem sucesso, a inserção do DNA obtido, utilizando o método de choque térmico em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) Omp8, um novo *stock* de células.

Quando, posteriormente, se utilizou o método de eletroporação e o novo *stock* de células a transformação foi bem-sucedida, como se pode constatar pelo aparecimento de colónias nas placas de LBagar com ampicilina.

#### 4.1.3.3 - Produção de OmpF recombinante

Efetuar-se-iam quatro produções de OmpF recombinante cujas principais diferenças se encontram representadas na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6 Principais diferenças entre as produções e quantidade de OmpF recombinante obtida em cada produção.**

	Data <i>Stock</i> de inóculo inicial	Procedimento efetuado 6 horas após indução	Equipamento de homogeneização	Quantidade de proteína obtida (mg)	Volume de inóculo (L)
<b>1<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Congelou-se o pellet	Homogeneizador	50,3	2
<b>2<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Adicionou-se 100 $\mu$ L de PMSF (50 g/L) ao <i>pellet</i> e congelou-se	Homogeneizador	65,23	4
<b>3<sup>a</sup> Produção</b>	10/2006	Guardaram-se os inóculos a 4°C durante a noite e centrifugaram-se na manhã seguinte	<i>French Press</i>	9,29	4
<b>4<sup>a</sup> Produção</b>	11/2012	Ressuspendeu-se o <i>pellet</i> após a centrifugação e guardou-se a 4°C durante a noite	<i>French Press</i>	26,07	4

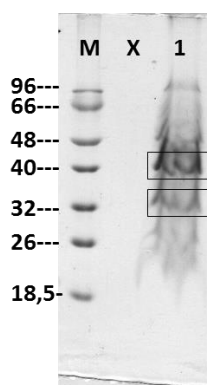
Na 1<sup>a</sup> produção a quantidade de proteína obtida (50,3 mg) foi bastante satisfatória, comparativamente com outras produções anteriormente descritas<sup>59</sup>.

Na Figura 4.10 é possível observar que as bandas obtidas não são linhas como seria esperado mas sim curvas, isto deve-se ao facto de as amostras encontrarem-se dissolvidas em tampão contendo o detergente O-POE, em eletroforeses posteriores utilizou-se SDS em vez do detergente O-POE, de forma a evitar que as bandas obtidas sejam curvas.

A amostra apresenta uma banda por volta dos 46 kDa, valor aproximado dos 40 kDa esperados<sup>11</sup>, e uma banda por volta dos 33 kDa (não esperada). Esta banda poderá corresponder a uma desnaturação da proteína ou à produção de outras porinas (como a OmpA, 30 kDa, ou a

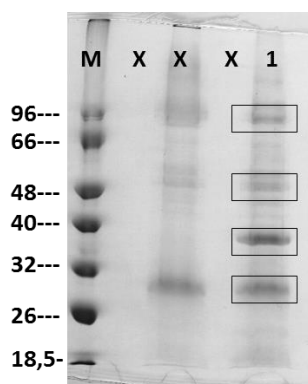


OmpR, 25 kDa) o que significaria que as células *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 teriam perdido a mutação que as impede de produzir outras porinas além da OmpF.



**Figura 4.10** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h20, amostras diluídas 1:3). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF final.

De forma a analisar a possibilidade da proteína estar desnaturada devido a ação de proteases adicionou-se uma maior quantidade de PMSF (inibidor de proteases) na 2ª produção. No entanto, observando a Figura 4.11, verifica-se novamente o aparecimento das bandas a 46 kDa e a 33 kDa o que indica que provavelmente estas não resultam da desnaturação da proteína. Também aparecem duas bandas a pesos moleculares superiores que poderão corresponder a alguma contaminação.



**Figura 4.11** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h10, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF final.

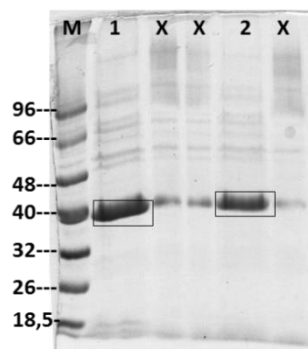
Na 3ª produção, após a incubação finalizada, não se procedeu à centrifugação dos inóculos. Deixou-se os mesmos durante a noite a 4°C de forma a diminuir o crescimento celular.

Os resultados obtidos revelaram que a quantidade de proteína obtida (9,29 mg) foi menor que a obtida nas produções anteriores, assim como não se conseguiu resolver o problema do aparecimento das bandas com um peso molecular diferente do da proteína em estudo (45 kDa, Figura 7.31, em anexo).

Por fim, na 4ª produção, utilizou-se um novo *stock* de células *E. coli* BL21 (DE3) Omp8 recentemente transformadas e procedeu-se à centrifugação dos inóculos, à ressuspensão dos *pellets* obtidos e ao seu armazenamento durante a noite a 4°C.

A quantidade de proteína obtida (26,07 mg) foi satisfatória comparativamente com as restantes produções e as bandas correspondentes a outras porinas não são visíveis no gel SDS-PAGE, como se pode observar na Figura 4.12.

As bandas mais intensas (assinaladas na Figura 4.12) possuem um peso molecular de 43,5 kDa (valor calculado de acordo com o descrito em 3.1.4 - Eletroforese SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio, eletroforese em gel de poliacrilamida), próximo do valor esperado (40 kDa)<sup>11</sup>.



**Figura 4.12** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de peso molecular (kDa); 1– OmpF antes da concentração e troca de tampão; 2 – OmpF final.

## **4.2 - Aplicações bionanotecnológicas de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* na detecção de malária recorrendo a métodos de imunodeteção**

### **4.2.1 - Sistema anticorpo/antigénio, 2E6/Hsp70**

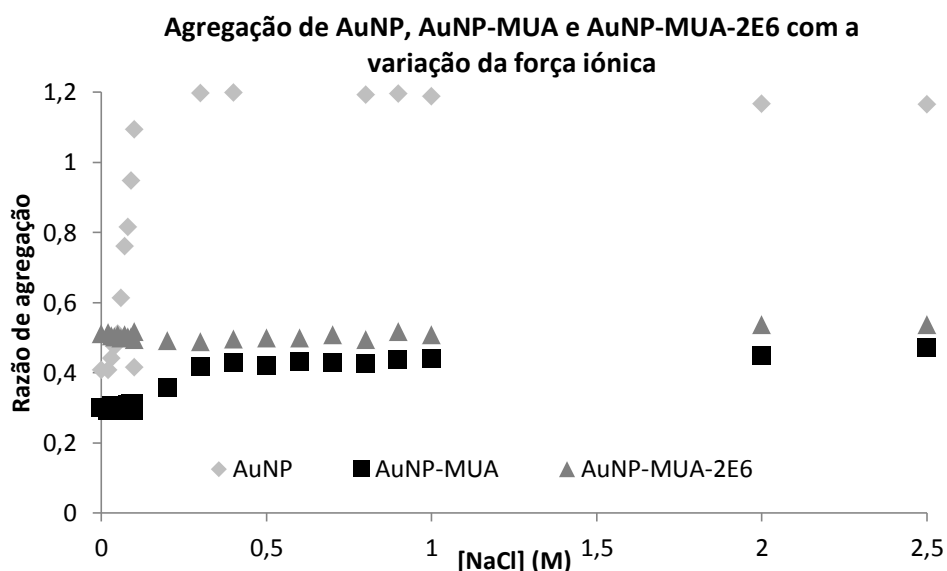
Avaliação da estabilidade dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 (BSA) ao longo do tempo e com a variação do pH e da força iónica do meio<sup>a</sup>

A estabilidade dos bionanoconjugados, utilizados nos diversos ensaios deste trabalho, depende de vários fatores, entre eles, valores de pH e de força iónica e tempo de armazenamento após a sua síntese. Deste modo, estes três fatores foram avaliados.

Quanto se varia a força iónica altera-se as condições de solvatação das nanopartículas, pois o sal adicionado (NaCl) dissocia-se nos iões  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e estes vão competir com as nanopartículas pelas moléculas de água. Quando as partículas deixam de estar solvatadas ficam expostas ao ião positivo que poderá cancelar as cargas negativas à superfície das mesmas levando à formação de agregados que quando atingem dimensões maiores tendem a precipitar.

Esta formação de agregados leva a uma alteração de cor da solução de nanopartículas de vermelho para azul e assim a um deslocamento da banda de SPR centrada a 525 nm (forma não agregada) para 600 nm (forma agregada). Assim sendo se a razão de absorvância entre a espécie agregada (máximo de absorvância a 600 nm) e a espécie não agregada (máximo de absorvância a 525 nm) sofre um aumento.

<sup>a</sup> Todos os espectros traçados para o cálculo das razões de agregação encontram-se em anexo.



**Figura 4.13 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função da concentração de sal (NaCl).**

Pela análise da Figura 4.13, verifica-se que a razão de agregação para os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) mantém-se por volta de 0,5 independentemente da quantidade de sal que é adicionada, até uma concentração final de sal de 2,5 M. Este resultado parece indicar que não ocorre agregação dos bionanoconjugados com o aumento da concentração de NaCl. O que indica que os bionanoconjugados mantêm-se estáveis com a variação da força iónica do meio. Observando os conjugados (AuNP-MUA) e as AuNP com um revestimento de citrato verifica-se haver um aumento da razão de agregação. No caso de AuNP-MUA de 0,3 para 0,45, o que não é uma variação muito significativa mas indica existir alguma agregação e no caso das AuNP a um aumento de 0,4 para 1,2.

Estes resultados demonstram que tanto os bionanoconjugados como os conjugados mantêm-se estáveis, existindo sempre uma maioria da forma não agregada, enquanto nas AuNP nota-se que por volta 0,1 M de NaCl existe um aumento da agregação.

Este resultado dever-se-á ao facto de as partículas se encontram revestidas por proteínas (BSA e anticorpo monoclonal 2E6) e MUA que possuem resíduos carregados e vão competir com os iões adicionados pelas moléculas de água, assim há uma menor agregação das AuNP pois a neutralização da carga superficial global das partículas é dificultada.

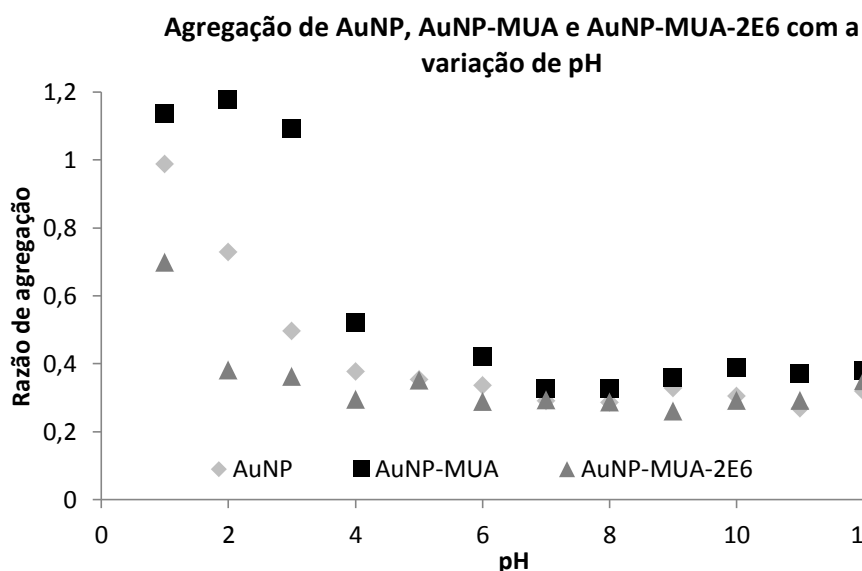
Também é necessário ter em conta que as camadas de MUA e anticorpo que revestem as AuNP são muito densas, o que dificulta a aproximação entre as partículas e a consequente agregação das mesmas, mesmo quando a carga global superficial é neutralizada.

Em relação ao valor de pH do meio pode-se observar na Figura 4.14, que o quociente entre a forma agregada e a forma não agregada não varia significativamente na gama de pH de 2 a 12 para AuNP-MUA-2E6 e na gama de pH entre 4 e 12 para AuNP-MUA e AuNP, o que é indicativo que os bionanoconjugados mantêm-se estáveis para esses mesmos valores de pH.

A agregação induzida pela variação de pH ocorre através da protonação das camadas de revestimento até ao valor do pKa das mesmas. Desta forma há, mais uma vez, neutralização da carga superficial das AuNP e consequentemente agregação.

No caso das AuNP-MUA os valor do pKa do MUA ligado às AuNP é de aproximadamente 3, logo a agregação destes conjugados ocorre por volta deste valor, como se pode ver na Figura 4.14.

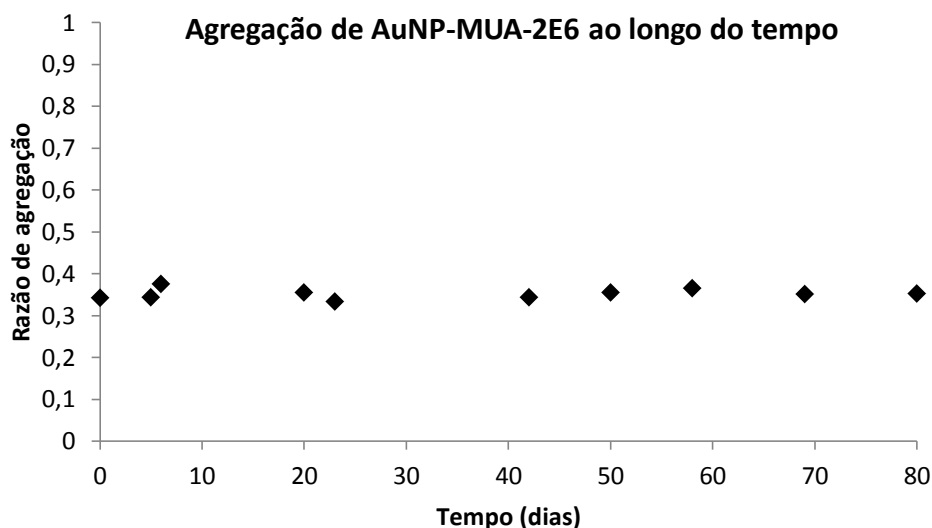
No caso dos bionanoconjugados a agregação apenas ocorre a valores de pH extremos, neste caso pH 1 e pH 13.



**Figura 4.14 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função do valor de pH.**

No que respeita à estabilidade ao longo do tempo (Figura 4.15) os resultados são consistentes com os obtidos anteriormente em relação ao valor de pH e de valor da força iónica do meio. Os conjugados AuNP-MUA-2E6 mantêm-se estáveis ao longo de aproximadamente 3 meses, tempo durante o qual foi realizado este estudo.

Ao longo deste estudo os conjugados foram mantidos a 4°C e armazenados em frascos de vidro escuro.

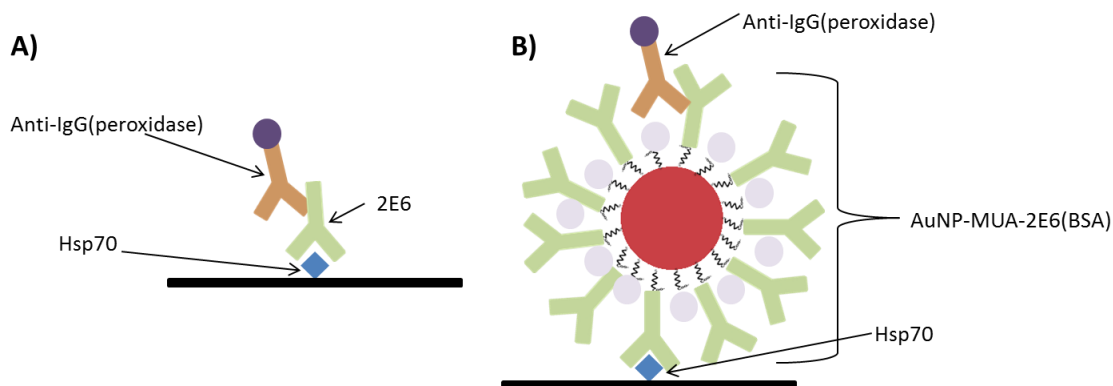


**Figura 4.15 Razão de absorvância da banda de SPR na forma agregada e não agregada ( $Abs_{600nm}/Abs_{525nm}$ ) em função do tempo.**

Em suma, este estudo indica que os bionanoconjugados são estáveis ao longo do tempo e com a variação quer da força iónica, quer do valor de pH do meio. Note-se que não foi efetuado qualquer estudo sobre o estado conformacional e a atividade do anticorpo adsorvido à superfície das AuNP funcionalizadas.

#### 4.2.2 - Ensaios de ELISA

Nas placas de ELISA adiciona-se primeiramente o antígeno (Hsp70), e após a incubação do mesmo os poços das placas foram sempre bloqueados com uma solução de BSA 2%, de seguida adiciona-se o anticorpo (2E6) ou os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6, bloqueados com BSA) e por fim são adicionados os anticorpos anti-IgG conjugados com uma peroxidase. Os conjugados foram também bloqueados com BSA de modo a manter o protocolo de síntese dos bionanoconjugados utilizado para as diferentes técnicas efetuadas. A Figura 4.16 apresenta um esquema da adição das diferentes moléculas à placa de ELISA.

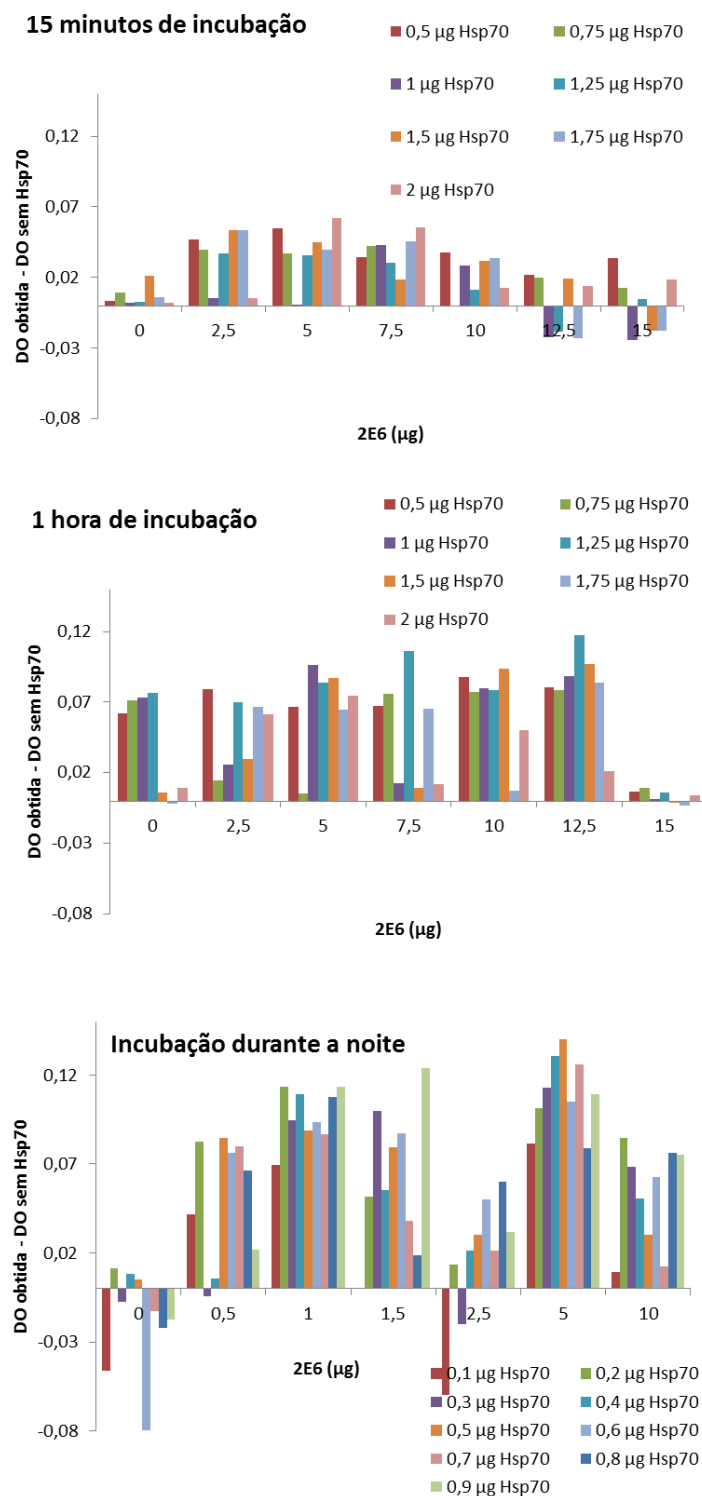


**Figura 4.16 Ilustração das diferentes camadas utilizadas nas placas de ELISA A) utilizando o anticorpo primário (2E6); B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6(BSA)).**

Nestes ensaios os resultados são apresentados em gráficos de barras em que uma barra correspondente a um valor positivo indica que ocorreu ligação entre o anticorpo (2E6) e o antígeno e uma barra negativa indica que esta ligação não terá ocorrido. Estas barras correspondem ao valor de densidade ótica obtido aos comprimentos de onda de 525 nm ou 450 nm em cada poço, subtraindo o valor da densidade ótica aos mesmos comprimentos de onda dos poços onde não foi adicionado antígeno (Hsp70).

##### 4.2.2.1 - Método de ELISA utilizando bionanoconjugados

Inicialmente foi testada a influência do tempo de incubação dos bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) com o antígeno Hsp70, anteriormente adicionada às placas. Nestes ensaios o comprimento de onda ao qual se mediu a densidade ótica foi de 525 nm, comprimento de onda correspondente à SPR das AuNP.



**Figura 4.17** Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 525 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6, com tempos de incubação de 15 minutos, 1 hora e durante a noite.

Através da Figura 4.17 é possível verificar que o tempo de incubação dos bionanoconjugados com o antígeno é um importante parâmetro neste estudo. Aumentando este tempo de 15 minutos para 1 hora, aumenta-se o número de resultados positivos de 86% para 92% (percentagem calculada a partir do quociente entre o número de resultados positivos e o número de resultados totais) e também a ordem de grandeza dos valores positivos para aproximadamente o dobro (o máximo de densidade ótica com 15 minutos de incubação é de 0,062, enquanto o máximo de densidade ótica a 525 nm com 1 hora de incubação é de 0,12). No

entanto ao aumentar o tempo de incubação para aproximadamente 16 horas a percentagem de resultados positivos baixa para 86%. Assim o tempo de incubação de 1 hora aparenta ser o mais indicado a utilizar.

Testaram-se também três razões anticorpo/AuNP, sendo as razões escolhidas 25, 50 e 75, tendo em conta ensaios de mobilidade eletroforética em géis de agarose efetuados anteriormente no laboratório. Através destes géis é possível calcular a quantidade máxima de anticorpos que se pode adicionar por partícula através da distância de migração dos bionanoconjugados quando é aplicado um campo elétrico. A aplicação deste campo elétrico faz com que as AuNP se desloquem em direção ao polo positivo (pois estas possuem carga global negativa). Quando as AuNP se encontram cobertas com um agente de revestimento e com proteínas existe uma alteração da carga global à superfície, passando esta a ser neutra. Logo quando menos migração houver mais recobertas estão as AuNP pois menos negativa é a carga global à superfície.

A Figura 4.18 mostra um gel de agarose onde se pode constatar que começa a haver estabilização da distância de migração por volta da razão de 50 anticorpos por AuNP.

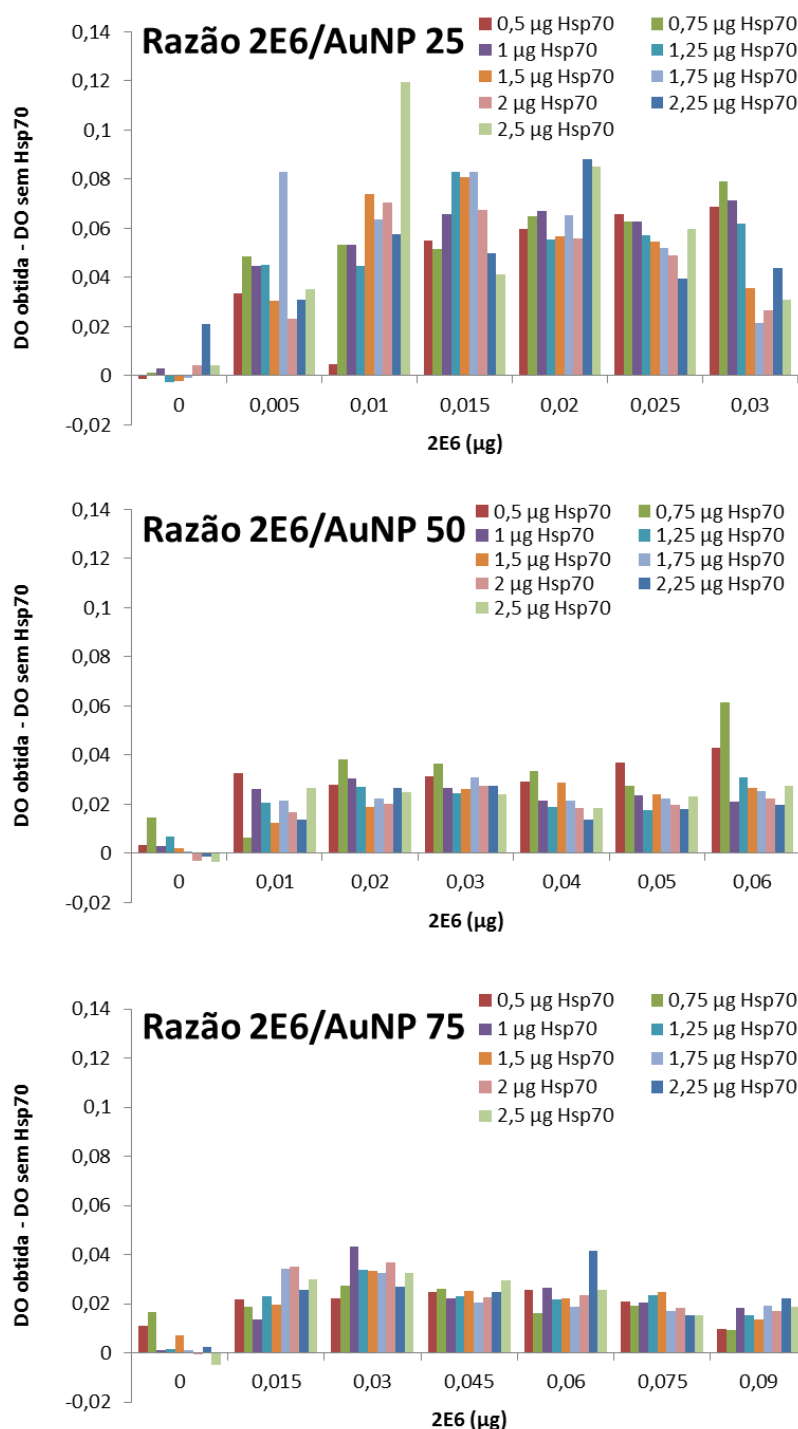


**Figura 4.18 Eletroforese em gel de agarose dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6, com diferentes razões de 2E6/AuNP indicadas em cada poço.<sup>b</sup>**

Os principais resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.19.

---

<sup>b</sup> Este gel foi executado pelo colega José Silva do laboratório em que o trabalho foi feito.



**Figura 4.19** Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 525 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6, com diferentes razões de 2E6/AuNP nomeadamente 25, 50 e 75, mantendo a quantidade de ouro adicionada.

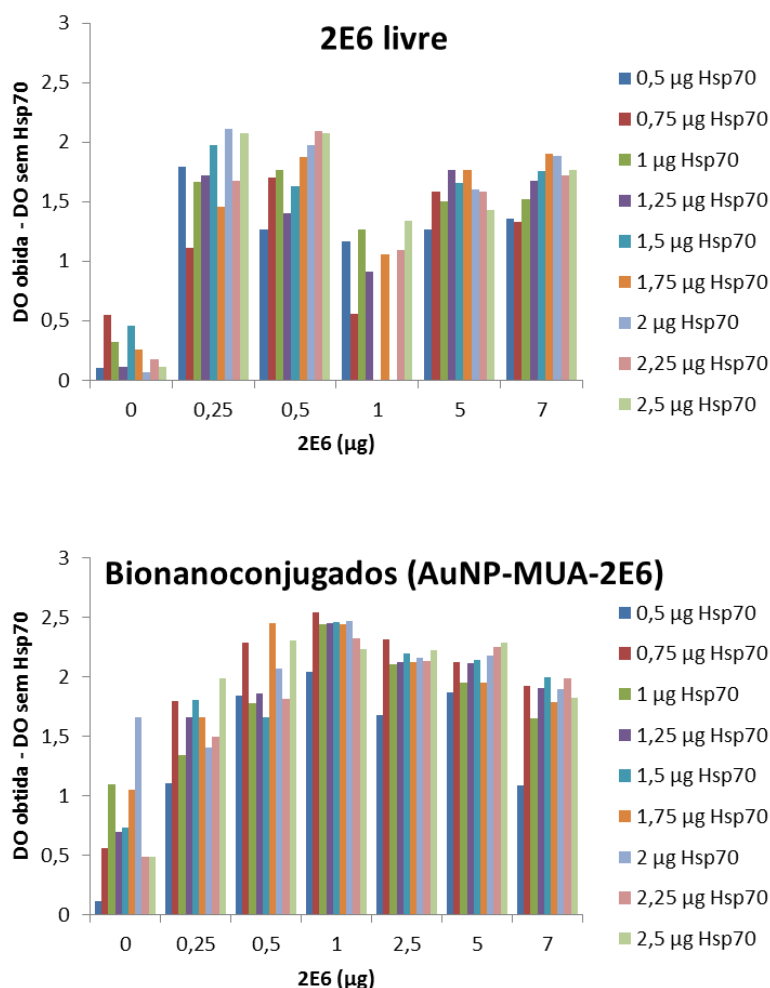
Observando a Figura 4.19 é possível verificar que a percentagem de resultados positivos em relação aos resultados totais não varia de forma muito significativa para razões anticorpo/AuNP, sendo de 94% para a razão 25, 95% para a razão 50 e 97% para razão de 75, embora a ordem de grandeza dos valores de densidade ótica seja diferente. A razão de 25, comparativamente com as outras razões foi considerada a mais adequada, pois é a que apresenta resultados correspondentes a maior intensidade de sinal.



Desta forma para os restantes ensaios utilizou-se um tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora e uma razão anticorpo/AuNP de 25 (25 anticorpos para cada nanopartícula de ouro).

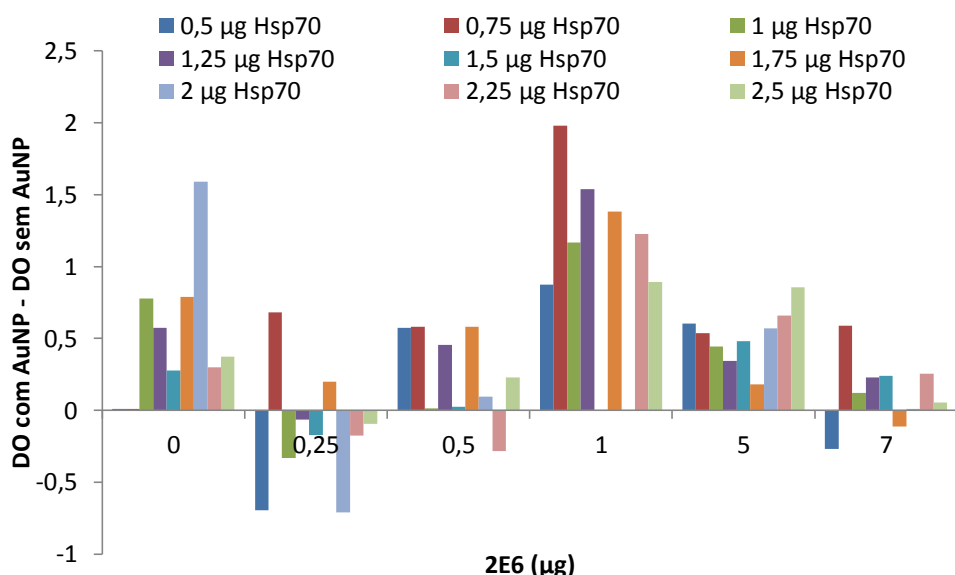
#### 4.2.2.2 - ELISA tradicional vs ELISA utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6)

Para se avaliar os possíveis benefícios da utilização de bionanoconjugados em vez do anticorpo livre, utilizou-se as duas formas com o mesmo procedimento ou seja efetuou-se o mesmo procedimento mas numa zona da placa adicionaram-se os bionanoconjugados enquanto na outra adicionaram-se os anticorpos livres. Sendo que neste procedimento foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG) conjugado com uma peroxidase que utiliza o OPD como substrato, conduzindo a uma cor laranja aquando da sua conversão. Esta alteração da cor a ser analisada (que até este momento era o vermelho, cor característica da nanopartículas de ouro) fez com que se alterasse o comprimento de onda ao qual se fez as medições de 525 nm para 450 nm. Os principais resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4.20.



**Figura 4.20** Gráficos representativos do valor da densidade ótica a 450 nm em função das quantidades de Hsp70 e de 2E6 (livre ou conjugado).

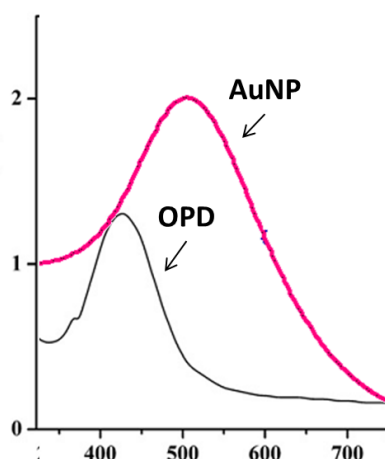
Comparando os dados apresentados na Figura 4.20 verifica-se que a presença das nanopartículas de ouro aumenta o valor da densidade ótica obtida a 450 nm. De forma a comprovar, procedeu-se ao cálculo da diferença entre valores obtidos em ambos os gráficos da Figura 4.20, como representado na Figura 4.21.



**Figura 4.21** Gráfico representativo da diferença de densidade ótica a 450 nm entre os bionanoconjugados e o anticorpo livre, em função da quantidade de 2E6.

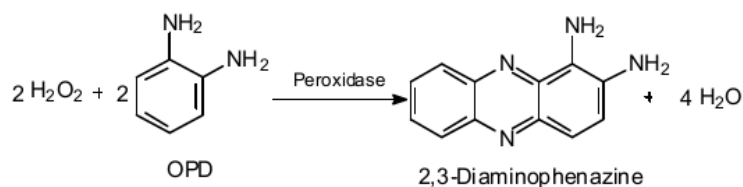
A Figura 4.21 demonstra que para a maioria dos casos existe um aumento médio da densidade ótica na ordem das 0,4 unidades, o que demonstra que as nanopartículas de ouro tem uma influência positiva neste ensaio, e a sua utilização aumenta a sensibilidade da técnica. No entanto comparando com estes resultados com os resultados obtidos por exemplo por Ambrosi *et al.*<sup>26</sup> onde se obtém um aumento na ordem de 1 unidade chega-se à conclusão que este ensaio ainda poderá ser melhorado, sendo uma das alterações a tentar fazer-se a conjugação do anti-IgG às AuNP em vez do 2E6 tal como foi feito por Ambrosi *et al.*<sup>26</sup>.

Este aumento de intensidade da densidade ótica a 450 nm quando são utilizados bionanoconjugados pode ser explicado pelo facto de as AuNP de 450 nm ser um valor de comprimento de onda próximo do valor do máximo da SPR das AuNP onde o valor da densidade ótica das AuNP já é significativo e assim a 450 nm o valor da densidade ótica resulta de dois contributos, as AuNP e o OPD (Figura 4.22), em vez de ser só do OPD como acontece no método de ELISA tradicional.



**Figura 4.22** Sobreposição de um espectro de absorvância típico das AuNP com um espectro de absorvância típico do OPD<sup>60</sup>.

Outra explicação tem vindo a ser reportada em diversas publicações onde as AuNP auxiliam da amplificação de sinal auxiliando a reação enzimática da peroxidase que se encontra conjugada ao anticorpo anti-IgG (Figura 4.23).<sup>25,26,61</sup> As AuNP vão atuar como centros condutores para facilitar a passagem dos eletrões durante a reação enzimática.

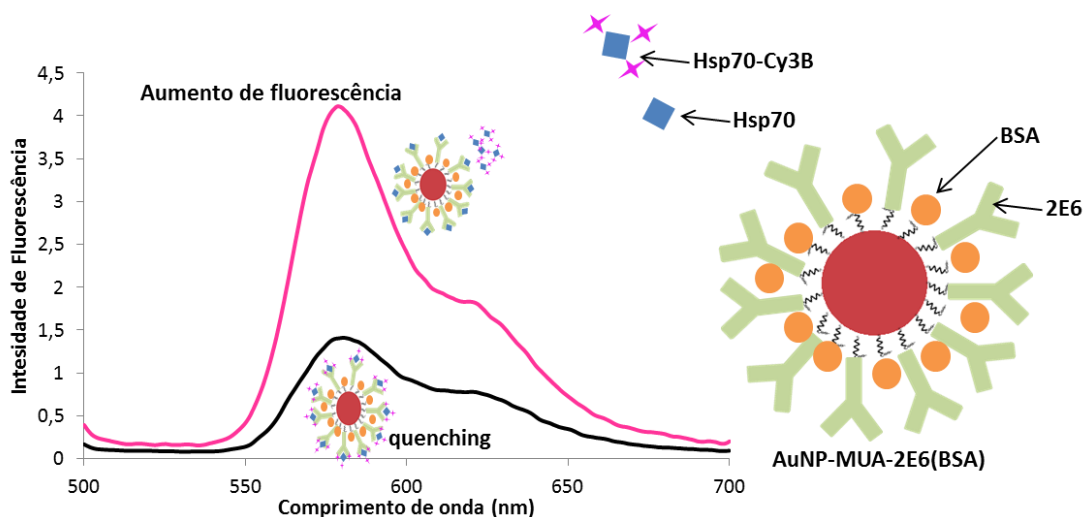


**Figura 4.23** Reação entre o OPD e o peróxido de hidrogénio para formação do produto de cor laranja (2,3-Diaminophenazine).

#### 4.2.3 - Ensaios de Fluorescência

Neste capítulo será abordado um método de quantificação fluorométrico através de um ensaio competitivo entre antígeno (Hsp70) marcado com um fluoróforo (Cy3B) de concentração conhecida e antígeno livre de concentração conhecida para elaboração de retas de calibração e de concentração desconhecida em amostras biológicas infetadas e não infetadas.

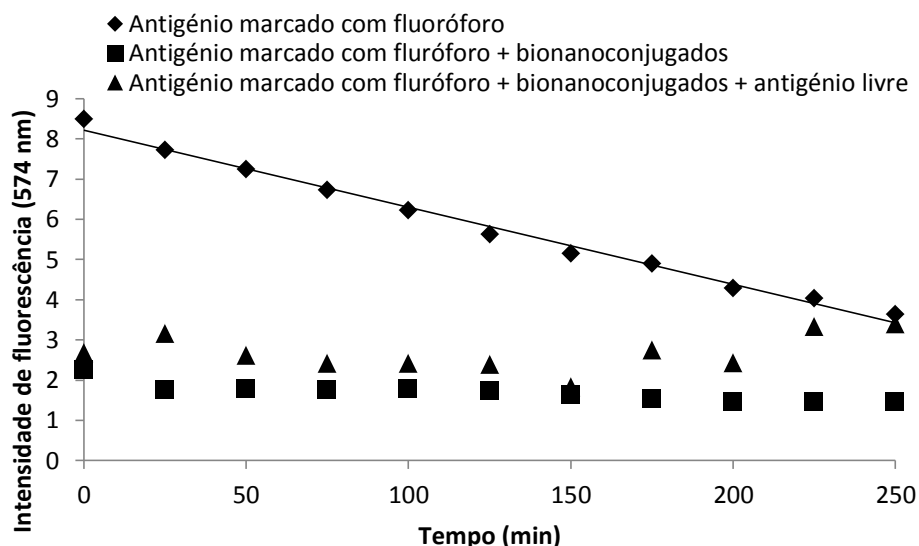
Este é um ensaio competitivo em que se espera que quando o antígeno marcado com o fluoróforo se liga aos bionanoconjugados a fluorescência emitida pelo fluoróforo é atenuada (fenómeno de *quenching*). Com a adição de antígeno livre espera-se que a quantidade de antígeno marcado com o fluoróforo que se liga aos bionanoconjugados seja menor e assim existe uma maior intensidade de fluorescência, causada pelo antígeno marcado desligado das AuNP presente em solução.



**Figura 4.24** Esquema ilustrativo do ensaio fluorimétrico competitivo.

De modo a estudar a estabilidade do sistema utilizado durante os ensaios procedeu-se à realização de espectros de fluorescência ao longo de 4 horas do antígeno marcado com o fluoróforo (Hsp70-Cy3B), de antígeno marcado com o fluoróforo juntamente com os bionanoconjugados (Hsp70-Cy3B + AuNP-MUA-2E6) e por fim da mistura composta pelo antígeno marcado pelo fluoróforo, os bionanoconjugados e o antígeno livre (Hsp70-Cy3B + AuNP-MUA-2E6 + Hsp70).

A Figura 4.25 mostra que ao longo do tempo o antígeno marcado com o fluoróforo sofre uma diminuição da intensidade de fluorescência.



**Figura 4.25** Intensidade de fluorescência a 574 nm em função do tempo (minutos) de uma solução de antígeno (Hsp70) marcado com o fluoróforo (Cy3B), de uma solução de antígeno marcado com fluoróforo juntamente com os bionanoconjugados e de uma solução de antígeno marcado com fluoróforo juntamente com os bionanoconjugados e com o antígeno livre.

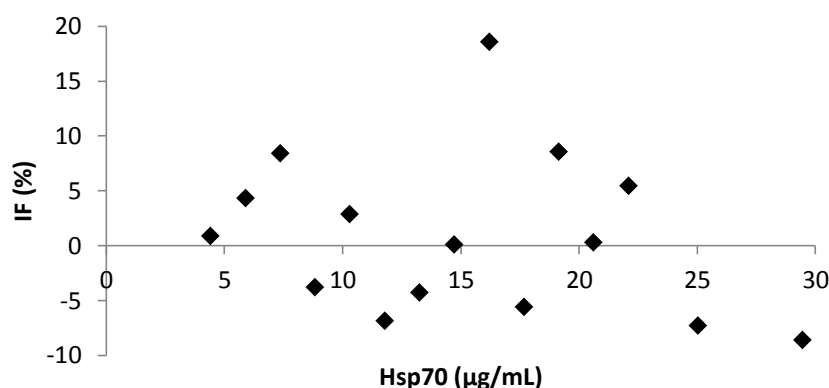
Quando a Hsp70 marcada com o Cy3B é adicionada aos bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) verifica-se uma diminuição pouco significativa da intensidade de fluorescência entre o tempo inicial e a medida efetuada aos 25 minutos. No entanto comparando o valor inicial da intensidade de fluorescência desta solução com o da solução de antígeno marcado nota-se uma diminuição da intensidade de fluorescência de 8,5 para 2,5 o que sugere que a ligação do antígeno marcado aos bionanoconjugados é instantânea. Após este tempo o valor da intensidade de fluorescência mantém-se estável ao longo do tempo (Figura 4.25), o que demonstra que a ligação do antígeno marcado aos bionanoconjugados é estável.

Quanto à mistura do antígeno marcado com os bionanoconjugados e com o antígeno livre (Hsp70-Cy3B + AuNP-MUA-2E6 + Hsp70), pode observar-se na Figura 4.25, que existe uma variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo, apesar de esta variação não ser muito significativa, pois é inferior a uma unidade.

A ligação do antígeno marcado com o fluoróforo aos bionanoconjugados é instantânea, logo não é necessário tempo de incubação para esta ligação ocorrer. No entanto quando na solução também está presente o antígeno livre pode-se verificar na Figura 4.25 que existe um ligeiro aumento da intensidade de fluorescência ao fim de 25 minutos, e com exceção do ponto aos 150 minutos o valor de intensidade de fluorescência mantém-se superior ao da solução sem antígeno livre. Assim sendo um tempo de incubação de aproximadamente 25 minutos será o suficiente.

Após este estudo, realizaram-se ensaios de acordo com o descrito por Guirgis *et al*<sup>27</sup>, sendo que se esperaria observar o fenómeno de *quenching* de fluorescência (atenuação de fluorescência) na medida correspondente ao branco, seguida de um aumento gradual do valor da intensidade de fluorescência, aquando da adição do antígeno livre. Apesar de anteriormente ter-se chegado à conclusão que a ligação do antígeno marcado seria instantânea e que a do antígeno livre demoraria cerca de 25 minutos, decidiu-se utilizar o tempo de incubação de 3 horas neste processo de forma a não haver diferenças em relação ao protocolo de Guirgis *et al*<sup>27</sup>.

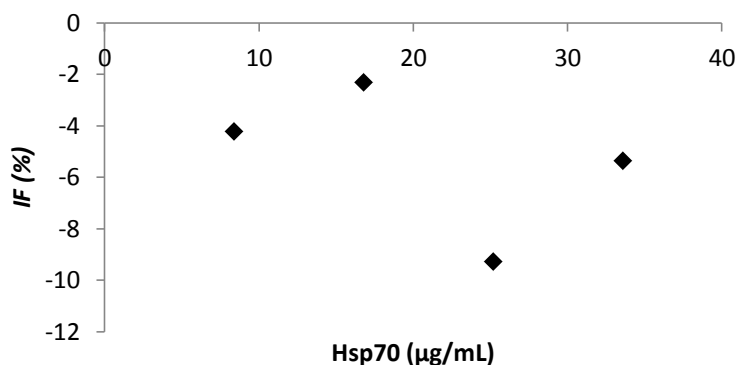
Os resultados obtidos não foram concordantes com os obtidos anteriormente por Guirgis *et al*, não tendo sido possível obter uma resposta linear positiva (Figura 4.26).



**Figura 4.26** Intensidade de fluorescência relativa (percentagem) em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 120 vezes superior à de AuNP, como método descrito por Guirgis *et al*<sup>27</sup>.

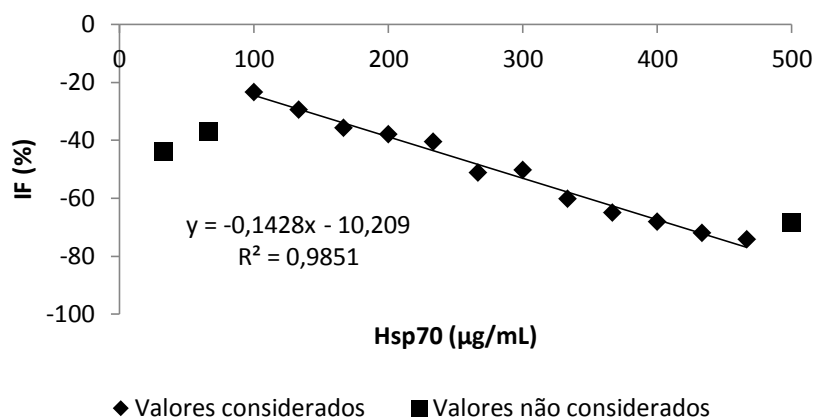
Estudos anteriores demonstraram que a razão MUA/AuNP de 120 revelou não ser suficiente para recobrir as nanopartículas de ouro, o que conduziu a um aumento desta razão para 5000 moléculas de MUA por AuNP, nos estudos seguintes.

Este aumento no valor da razão MUA/AuNP não levou a que os resultados obtidos fossem os esperados, ou seja não foi possível obter valores de intensidade de fluorescência que se comportassem de uma forma linear e que fossem aumentando com a adição de antígeno livre (Figura 4.27).



**Figura 4.27** Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, método descrito por Guirgis *et al*<sup>27</sup>

De forma a tentar obter um aumento na intensidade de fluorescência utilizou-se também uma maior concentração de Hsp70 livre, como o apresentado na Figura 4.28.

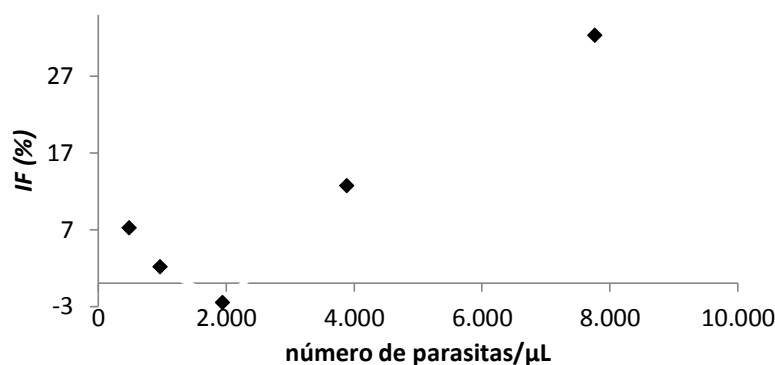


**Figura 4.28** Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, método descrito por Guirgis *et al*<sup>27</sup>.

A Figura 4.28 mostra um resultado linear, só que em vez de se observar um aumento da intensidade relativa de fluorescência, observa-se uma diminuição, o que indica que em vez de se observar um fenômeno de *quenching* de fluorescência inicial, está-se a observar um fenômeno de *enhancement* de fluorescência inicial (aumento do valor de intensidade de fluorescência da medida correspondente ao branco, ou seja só com o antígeno marcado com o fluoróforo) e uma diminuição da intensidade quando se adiciona o antígeno livre. Esta diferença de valores é indicativa de uma distância entre as AuNP e o antígeno marcado com um fluoróforo superior ao esperado (Figura 4.32)<sup>41</sup>, pois é desta distância que depende o fenômeno que irá ocorrer e esta distância depende da forma de ligação do anticorpo às AuNP. Se a distância for menor do que 5 nm ocorrerá o fenômeno de *quenching*, distância entre 5 e 10 nm ocorrerá o fenômeno de *enhancement*.<sup>41,42</sup>

Foi também analisada a presença do antígeno Hsp70 em cultura de eritrócitos de sangue humano infectado com *Plasmodium falciparum* com um nível de parasitemia de 3%.

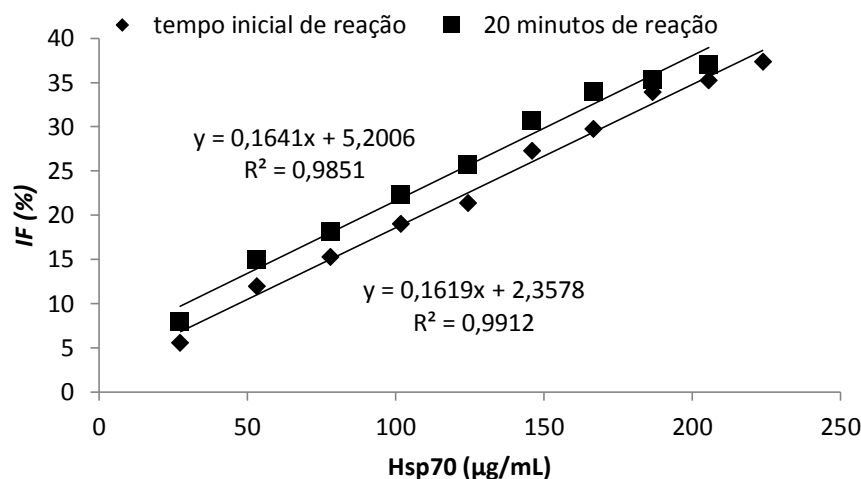
Assim, aplicou-se o ensaio a diferentes diluições de culturas infectadas, utilizando-se culturas não infectadas como controlo. Observou-se uma diminuição do valor de intensidade de fluorescência relativa (*quenching*) até uma concentração de 2000 parasitas/µL, seguida de um aumento da mesma (*enhancement*) para concentrações entre os 4000 e os 8000 parasitas/ µL. Os valores para números de parasitas assumem que um nível de parasitemia de 3% corresponde a  $1,75 \times 10^5$  parasitas por µL<sup>27</sup> (Figura 4.29).



**Figura 4.29** Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de parasitas numa amostra infectada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP.

Apesar dos resultados obtidos na Figura 4.28 poderem ser interpretados de uma forma positiva, ou seja apesar se observar uma diminuição do valor de intensidade de fluorescência relativa em vez de um aumento obteve-se uma resposta linear, estes não foram passíveis de serem reproduzidos. Por este motivo alterou-se o procedimento experimental utilizado.

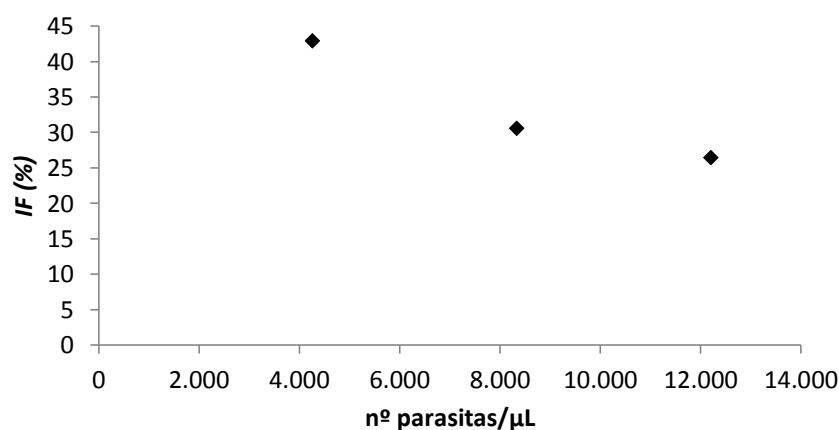
Nos estudos seguintes, concentrações conhecidas de Hsp70 foram adicionadas à mesma célula de fluorescência. As medidas foram realizadas ao tempo inicial (na altura da adição de Hsp70) e ao fim de 20 minutos, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 4.30.



**Figura 4.30** Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de Hsp70 não marcada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, com adição consecutiva de alíquotas de 2 µL de solução de Hsp70. As medições foram efetuadas ao tempo inicial após a adição do antígeno e 20 minutos após a adição do antígeno.

Comparando as retas obtidas na Figura 4.30 não verificam diferenças significativas nos valores de intensidade de fluorescência relativa, o que levou à realização dos ensaios ao tempo inicial. Estes resultados mostram também que inicialmente existe um fenómeno de *quenching*, seguido por um aumento da intensidade da fluorescência relativa com a adição de antígeno não marcado, confirmando o funcionamento do ensaio do modo esperado.

Passou-se então à utilização deste método utilizando culturas infetadas em substituição do antígeno livre, tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 4.31.



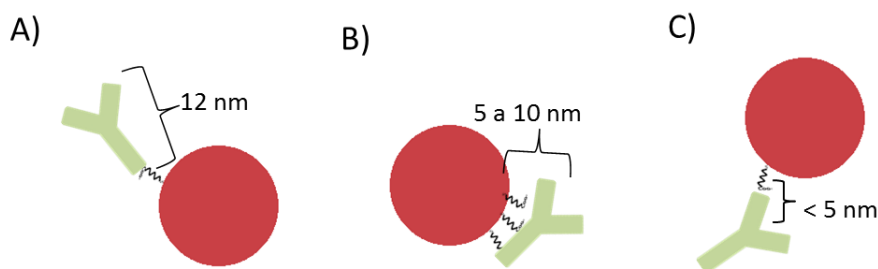
**Figura 4.31** Intensidade de fluorescência relativa em função da concentração de parasitas numa amostra infetada, utilizando bionanoconjugados com uma quantidade de MUA 5000 vezes superior à de AuNP, com adição consecutiva de alíquotas de 2 µL de cultura. As medições foram efetuadas ao tempo inicial após adição do antígeno.

Os resultados mostram um fenómeno contrário ao anteriormente obtido quando se utilizou a Hsp70 recombinante, ou seja apesar de haver um *quenching* inicial da amostra correspondente ao branco, a intensidade de fluorescência relativa vai diminuindo com o aumento da concentração de parasitas na cultura.

Estes resultados poderiam ser explicados com facto de as culturas serem complexas e possuírem outras proteínas que poderão influenciar a intensidade de fluorescência, no entanto tendo em conta que o branco da medida corresponde à cultura não infetada estas interferências deveriam ser eliminadas. Ao longo deste trabalho não foi possível obter um método robusto para a quantificação de Hsp70, pois os resultados demonstram uma mistura dos dois fenómenos, *enhancement* e *quenching*.

Esta mistura de fenómenos pode ser explicada pela distância do fluoróforo (conjugado com o antígeno) às AuNP. Esta distância dita que fenómeno deverá acontecer, se esta distância for inferior a 5 nm observa-se o fenómeno de *quenching*<sup>42</sup> e se for entre 5 e 10 nm observa-se o fenómeno de *enhancement*<sup>41</sup>.

No sistema em estudo a distância pode variar de acordo com a forma de ligação do anticorpo às AuNP, sendo que a molécula de MUA tem um tamanho de cerca de 2 nm e o anticorpo de 10 nm, tamanhos determinados no laboratório em que o trabalho foi realizado através do método de DLS (*Dynamic Light Scattering*)<sup>c</sup>.



**Figura 4.32** Diferentes formas de ligação do anticorpo às AuNP, modificando a distância da zona de ligação do anticorpo ao antígeno em relação às AuNP. A) Distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP de 12 nm; B) Distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP de 5 a 10 nm; C) distância da zona de ligação do anticorpo à AuNP inferior a 5 nm.

Observando a Figura 4.32 pode-se concluir que estas diferentes formas de ligação do anticorpo à AuNP levam a diferentes fenómenos. No caso da Figura 4.32 A) o antígeno marcado com o fluoróforo ligar-se-ia ao anticorpo, estando a uma distância de aproximadamente 12 nm da AuNP o que implica que as AuNP não terão influência no fluoróforo, isto é não ocorrem fenómenos de *enhancement* ou de *quenching*; no caso da Figura 4.32 B) o antígeno ligar-se-ia a uma distância que implicaria o fenómeno de *enhancement* enquanto o caso da Figura 4.32 C) implicaria o fenómeno de *quenching*.

Também se pode observar na Figura 4.25 que o valor de intensidade de fluorescência obtido é muito baixo quando comparado com outros trabalhos<sup>62,63</sup> e encontra-se cerca de 10 vezes abaixo o limite de deteção do aparelho. Isto pode ser indicativo da utilização de uma quantidade insuficiente de antígeno marcado com o fluoróforo ou de que existem problemas com a forma de marcação do antígeno e a maioria do fluoróforo é eluído durante as lavagens.

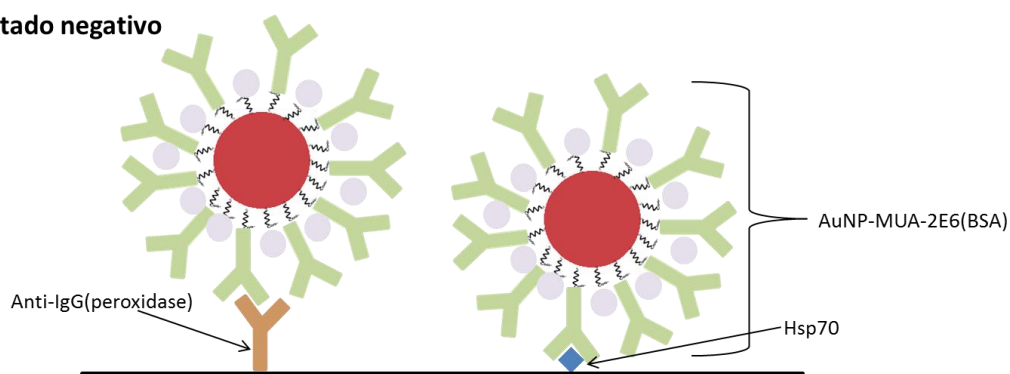
Em suma, este é um sistema muito complexo que exige um estudo mais aprofundado, a nível da ligação do anticorpo às AuNP e do antígeno ao anticorpo, antes da sua aplicação como método de deteção do antígeno Hsp70 quer na sua forma de solução de proteína recombinante quer em amostras de cultura infetada.

<sup>c</sup> Ver anexo 7.2.1.3 - Dynamic Light scattering (DLS)<sup>23</sup>.

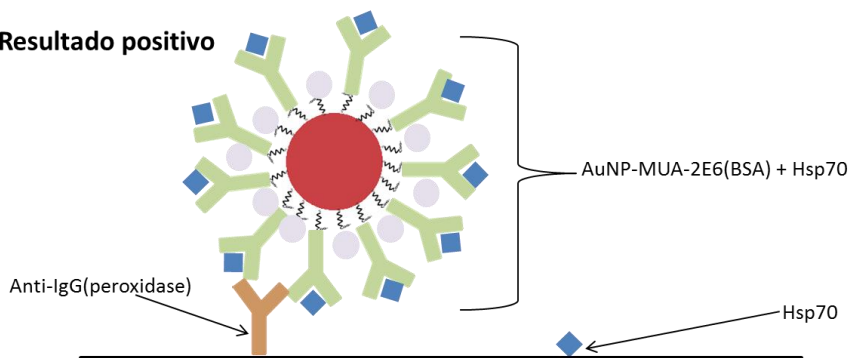


#### 4.2.4 - Ensaios em tiras de nitrocelulose

##### A) Resultado negativo



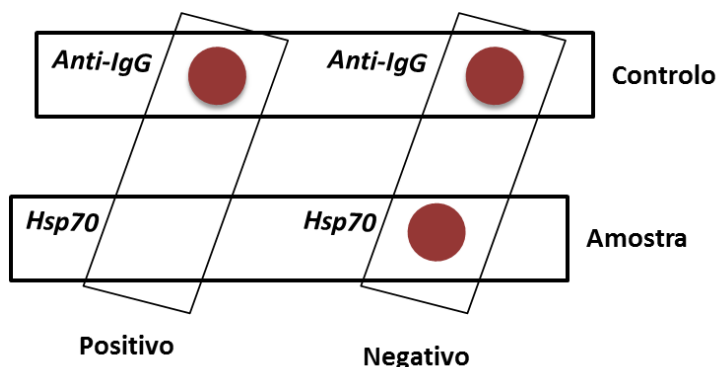
##### B) Resultado positivo



**Figura 4.33** Esquema de ensaio competitivo em tiras de nitrocelulose.

Sendo este um ensaio competitivo, não se espera obter a cor vermelha quando a amostra é positiva, pois neste caso os anticorpos (2E6) encontram-se ligados previamente ao antígeno (Hsp70). Quando não existe antígeno ou este está presente em baixa quantidade um aumento da intensidade da cor vermelha será observado (Figura 4.33).

Nos ensaios em tiras de nitrocelulose espera-se obter um resultado como o demonstrado na Figura 4.34. Em todas as tiras a quantidade de Hsp70 adicionada, foi a mesma (187 µg), e a concentração e volume de AuNP-MUA-2E6 foi de 10 nM e 5 mL respectivamente.

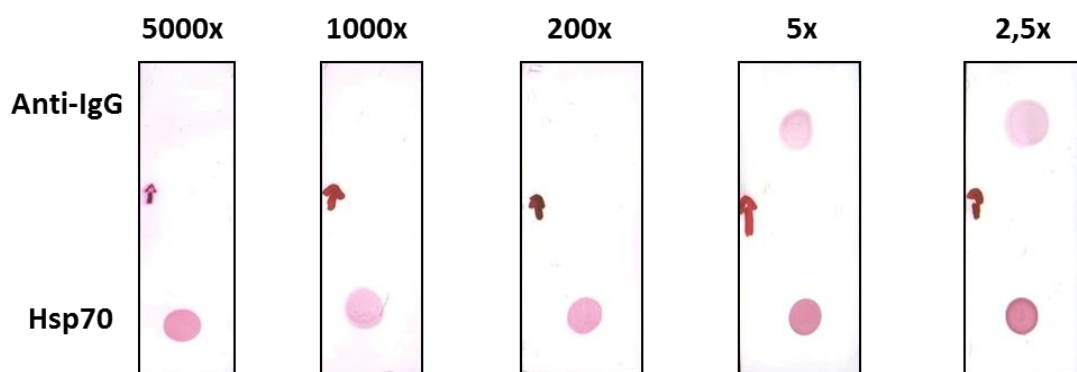


**Figura 4.34** Esquema ilustrativo dos resultados esperados nos ensaios em tiras de nitrocelulose.

Para o desenvolvimento do ensaio, diversos parâmetros foram otimizados.

Em primeiro lugar foi necessário determinar a diluição máxima de anti-IgG, sendo este diluído 5000, 1000, 200, 5, e 2,5 vezes.

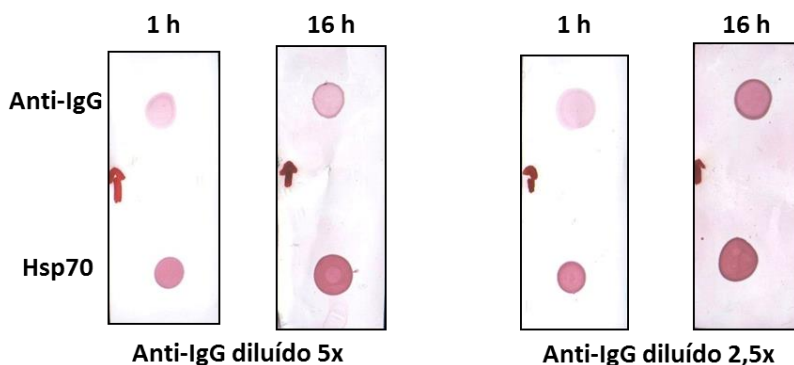
A Figura 4.35 ilustra os principais resultados obtidos. É possível observar o aparecimento de uma mancha vermelha apenas nas diluições de 5 e de 2,5 vezes. Sendo que a menor diluição apresenta uma cor mais intensa, como seria de esperar.



**Figura 4.35** Tiras de nitrocelulose contendo 187  $\mu\text{g}$  de Hsp70, 20  $\mu\text{L}$  de anti-IgG e mergulhadas em 5 mL de AuNP-MUA-2E6, 10 nM.

De forma a verificar como o tempo de secagem das tiras (secagem após a adição de Hsp70 e de anti-IgG à tira) influenciaria a intensidade de cor obtida deixou-se as tiras de nitrocelulose contendo anti-IgG com uma diluição de 5 e de 2,5 vezes secar 1 hora ou secar durante toda a noite (aproximadamente 16 horas).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.36.

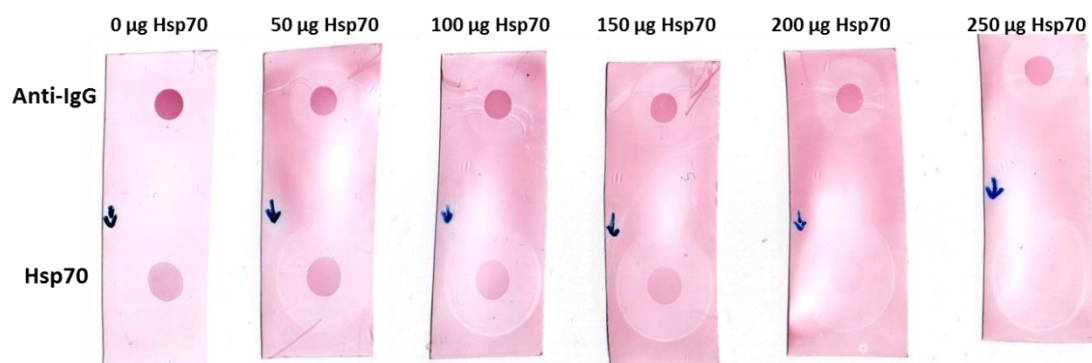


**Figura 4.36** Tiras de nitrocelulose contendo 187  $\mu\text{g}$  de Hsp70, anti-IgG com diluição de 5 ou 2,5 vezes e incubadas 1 ou 16 horas.

Através da Figura 4.36 pode-se concluir que os melhores resultados foram obtidos com uma diluição de 2,5 vezes de anti-IgG e um tempo de secagem de aproximadamente 16 horas.

Seguidamente foi determinada a quantidade mínima de antígeno (Hsp70) possível de ser detetada. Desta forma adicionou-se diferentes quantidades de Hsp70 à solução de bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6). Estimou-se que os bionanoconjugados teriam uma quantidade de anticorpo (2E6) de aproximadamente 188  $\mu\text{g}$  e testaram-se quantidades de Hsp70 inferiores e superiores a este valor.

Na Figura 4.37 encontram-se os resultados obtidos.

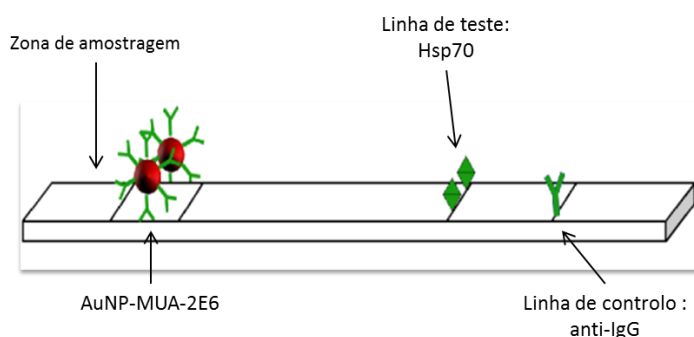


**Figura 4.37** Tiras de nitrocelulose contendo 187 µg Hsp70, anti-IgG com uma diluição de 2,5 vezes, secas durante 16 horas e mergulhadas em 5 mL de AuNP-MUA-2E6 contendo quantidades de Hsp70 entre 0 e 250 µg.

Através dos resultados apresentados na Figura 4.37 é possível verificar que o limite de detecção do ensaio encontra-se entre as 200 e as 250 µg de Hsp70 (que equivale a uma concentração de parasitas entre 5700 e 7100<sup>d</sup> parasitas/µL), pois é a partir deste valor que a mancha vermelha correspondente à Hsp70 recombinante na tira deixa de ser visível.

Neste momento, todo o tempo envolvido até à obtenção do resultado final, após o processo de secagem, é um pouco elevado para o que se pretende (aproximadamente 3 horas, 1 hora de reação entre os bionanoconjugados e a Hsp70 e 2 horas de reação entre a tira de nitrocelulose e a mistura dos bionanoconjugados-Hsp70), pois neste tipo de ensaios pretende-se chegar a um resultado final no mínimo de tempo possível, de preferência apenas alguns minutos. No entanto estes são resultados promissores, que indicam que este sistema será passível de ser utilizado em testes de diagnóstico rápido.

Para que tal seja possível, e de forma a diminuir o tempo de resposta, será necessário estudar um novo tipo de suporte para o teste de forma a permitir que os bionanoconjugados estejam imobilizados na tira e quando a amostra é adicionada exista migração dos mesmos até uma linha de teste contendo Hsp70 imobilizada, e no caso de uma amostra negativa os bionanoconjugados ligar-se na mesma, no caso de uma amostra positiva os bionanoconjugados não se ligam à linha de teste mas apenas à linha de controlo onde se encontra o anti-IgG imobilizado. A linha de controlo deverá aparecer sempre quer a amostra seja positiva ou negativa.



**Figura 4.38** Esquema ilustrativo de um teste de diagnóstico rápido para a detecção de Hsp70.

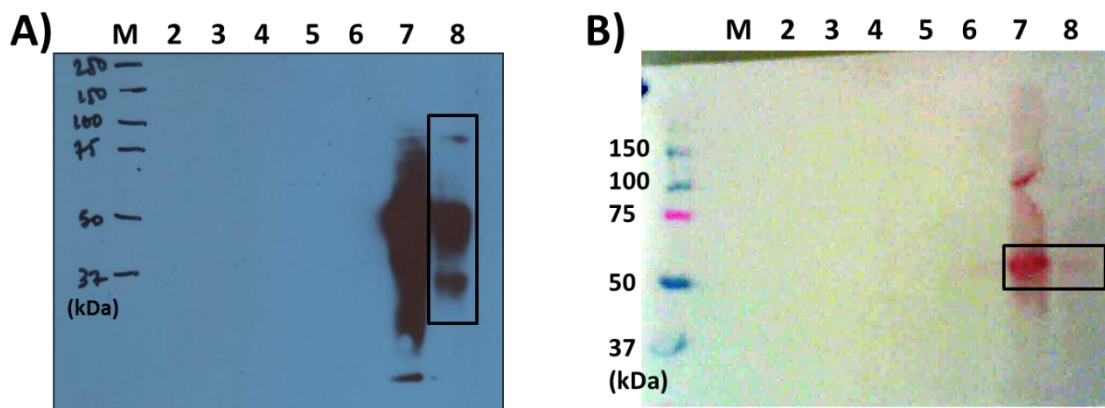
#### 4.2.5 - Ensaio de Western-blot

Efetuarão-se ensaios de *Western-blot*, de forma detetar a presença da HRPII com os anticorpos monoclonais anti-HRPII (designados por 2G12 fornecido pela Professora Doutora Diane

<sup>d</sup> Este valor foi calculado a partir do descrito por guirgis *et al*<sup>27</sup> onde é indicado que 2000 parasitas/µL equivale a 14,9 µg/mL de Hsp70.

Taylor, Universidade do Hawaii; e o anti-HRP<sup>II</sup> monoclonal obtido comercialmente) ao antígeno (proteína HRP<sup>II</sup>) e a possibilidade de utilizar os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12 ou AuNP-MUA-anti-HRP<sup>II</sup>) para a revelação dos resultados neste método.

A presença de HRP<sup>II</sup> recombinante ao longo do processo de produção e purificação da proteína foi verificada por *Western-Blot* usando o anticorpo monoclonal 2G12, como ilustra a Figura 4.39.



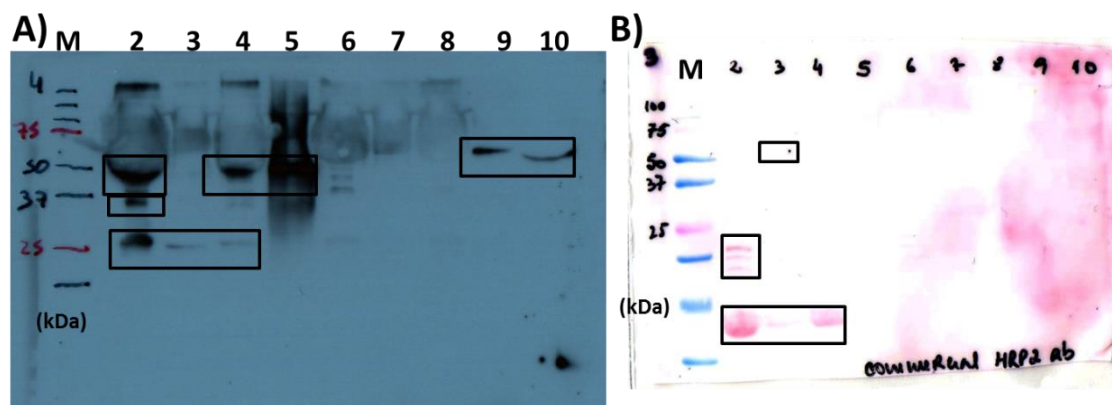
**Figura 4.39** Detecção da presença de HRP<sup>II</sup> recombinante ao longo do processo de produção e purificação da proteína. Revelação dos resultados de *Western-Blot* A) por quimioluminescência B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12). M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura de *E. coli* antes de indução com ITPG; 3 - Cultura de *E. coli* após de indução com ITPG; 4 - *Pellet* após 1ª centrifugação; 5 - Amostra após a *French Press*; 6 - Eluído da coluna de Ni-NTA; 7 - Eluído com tampão de lavagem; 8 - Proteína (HRP<sup>II</sup>) final, 0,34 mg/mL.

Observando a Figura 4.39 A) é possível verificar que o anticorpo deteta a HRP<sup>II</sup> nas frações 7 e 8, que correspondem ao eluído com tampão de lavagem e à proteína final obtida.

Na fração 7 observa-se uma mancha contínua e não bandas distintas, o que pode ser indicativo de uma grande quantidade de proteína (HRP<sup>II</sup> recombinante) ou que o anticorpo se liga a outras proteínas presentes na amostra. Na fração 8, distinguem-se 3 bandas com uma massa molecular de 85, 50 e 37 kDa. Nesta fração apenas se esperava o aparecimento de uma banda a 50 kDa, de acordo com os resultados obtidos por Ndonwi *et al*<sup>7</sup>, no entanto de acordo com Lee *et al*<sup>8</sup> a banda que se observa a 37 kDa poderá corresponder à HRP<sup>III</sup>, que é uma proteína muito semelhante à HRP<sup>II</sup> e que também é produzida pelo *Plasmodium falciparum*.<sup>6</sup>, enquanto a banda por volta dos 85 kDa poderá corresponder à própria HRP<sup>II</sup> ou à KAHRP (também conhecida como HRP<sup>I</sup>), proteína rica em histidinas e leucinas e composta por três péptidos.<sup>64</sup>

A Figura 4.39 B) mostra que nas frações 7 e 8 a proteína em estudo (HRP<sup>II</sup>), com uma massa molecular de 50 kDa é detetada pelos bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12) na fração 7 também foi detetada uma banda por volta dos 100 kDa que provavelmente corresponde à HRP<sup>I</sup>.

A detecção do antígeno é possível pelos dois métodos de revelação, no entanto o método utilizando os bionanoconjugados aparenta ser mais específico, pois é possível observar bandas definidas enquanto no método de quimioluminescência observam-se manchas. O facto de serem observadas manchas em vez de bandas pode significar que o antígeno (HRP<sup>II</sup>) se encontra a uma concentração demasiado elevada levando a um excesso de sinal ou que estarão a ocorrer ligações a outras proteínas presentes nas amostras. De forma a confirmar qual a hipótese correta dever-se-ia ter repetido este procedimento utilizando uma maior diluição das amostras. A partir destes resultados também é possível concluir que os bionanoconjugados (AuNP-MUA-2E6) estão ativos pois conseguem detetar o antígeno.

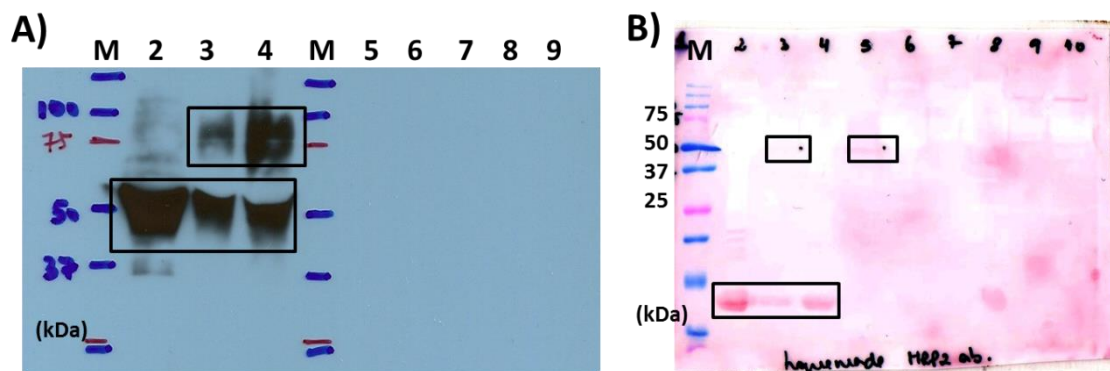


**Figura 4.40** Detecção da presença de HRPII em cultura de eritrócitos infetada, cultura não infetada e num controlo de plasma humano de dador saudável. Revelação dos resultados de *Western-Blot* utilizando anti-HRPII comercial A) por quimioluminescência B) utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-anti-HRPII). M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - HRPII 0,2 mg/mL; 6 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 7 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 8 - Cultura não infetada; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 100 vezes; 10 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes.

De seguida pretendeu-se testar se este método poderia ser aplicado a amostras mais complexas, ou seja em vez da proteína pura ser aplicado a culturas infetadas, a culturas não infetadas e num controlo de plasma humano de um dador saudável, esperando que apenas se deteta-se a proteína por volta dos 50 kDa nas culturas infetadas.

Na Figura 4.40 A) observa-se que nas frações 2 e 4 (correspondentes à cultura infetada) e na fração 5 existe uma banda por volta dos 50 kDa, correspondente à HRPII. Na fração 2 também é possível observar uma banda por volta dos 37 kDa, que mais uma vez poderá corresponder à proteína HRPIII. Nas três frações correspondentes à cultura infetada (2, 3 e 4) também se observa uma banda por volta dos 25 kDa, esta banda também é observada na fração 2 da Figura 4.40 B). Nas duas frações correspondentes à amostra de plasma de um dador saudável (frações 9 e 10 da Figura 4.40 A)) observa-se uma banda por volta dos 60 kDa que poderia ser interpretada como sendo HRPII, no entanto sendo este um dador saudável não terá HRPII no plasma. A identificação desta banda até ao momento é desconhecida. A Figura 4.40 B) apenas possui uma banda por volta dos 50 kDa na fração 3, que corresponde à proteína em estudo, detetada na cultura infetada diluída 2,5 vezes. Na fração 2 observa-se um conjunto de 3 bandas por volta dos 20 kDa, que não foi possível identificar a que proteína estas bandas correspondem, assim como 1 banda por volta dos 10 kDa nas frações 2, 3 e 4 na Figura 4.40 B).





**Figura 4.41** Detecção da presença de HRPII em cultura de eritrócitos infetada, não infetada e num controlo de plasma humano de dador saudável. Revelação dos resultados de *Western-Blot* onde se utilizou 2G12 (fornecido pela Professora Doutora Diane Taylor) A) por quimiluminescência; M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 6 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 7 - Cultura não infetada; 8 - Plasma humano de dador saudável diluído 5 vezes; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes. B) Utilizando bionanoconjugados (AuNP-MUA-2G12); M - padrão de pesos moleculares; 2 - Cultura infetada concentrada 2,5 vezes; 3 - Cultura infetada diluída 2,5 vezes 4 - Cultura infetada; 5 - HRPII 0,2 mg/mL; 6 - Cultura não infetada concentrada 5 vezes; 7 - Cultura não infetada diluída 2,5 vezes; 8 - Cultura não infetada; 9 - Plasma humano de dador saudável diluído 100 vezes; 10 - Plasma humano de dador saudável diluído 25 vezes.

A Figura 4.41 A) mostra que todas as frações correspondentes à cultura infetada (frações 2, 3 e 4) possuem uma banda correspondente à HRPII (banda 50 kDa), ainda se observa na fração 2 uma banda mais ténue por volta dos 37 kDa que poderá corresponder à HRPIII e uma banda entre os 75 e os 100 kDa nas frações 3 e 4 que poderá corresponder à HRPI. Nas frações correspondentes à cultura não infetada e ao plasma do dador saudável (frações 5 a 9) não se observa o aparecimento de qualquer banda, tal como esperado.

Na Figura 4.41 B) observa-se o aparecimento de uma banda aos 13 kDa nas frações 2, 3 e 4 como anteriormente visualizado na Figura 4.40 B). Na fração 3, que corresponde à cultura infetada concentrada e na fração 5 (HRPII recombinante pura), observa-se uma banda por volta dos 50 kDa que corresponde à proteína de interesse, HRPII.

Segundo os resultados obtidos na Figura 4.40 e na Figura 4.41 chega-se à conclusão que o método de revelação por quimiluminescência é mais sensível que o método de revelação utilizando os bionanoconjugados, pois enquanto no método de quimiluminescência é possível a deteção da HRPII na em quase todas as culturas infetadas, no método utilizando os bionanoconjugados a deteção não é possível em várias amostras (amostras 2 e 4 da Figura 4.41 B) e nas amostras 2, 4 e 5 da Figura 4.40), incluindo uma correspondente à HRPII pura (amostra 5 da Figura 4.40) e quando é possível as bandas são muito ténues. Isto pode ser indicativo que os bionanoconjugados não se encontravam muitos ativos. Esta falta de atividade dos bionanoconjugados poderá ser explicada se os anticorpos não se estiverem a ligar. Isto significa que é necessário um estudo mais aprofundado dos bionanoconjugados AuNP-MUA-anti-HRPII, a nível da sua estabilidade e da razão utilizada anticorpo/AuNP de forma a obter melhores resultados.

É necessário ter em conta que a utilização dos bionanoconjugados para a revelação nesta técnica é um método de deteção direta, e métodos de deteção diretas em *western-blot* são por norma menos sensíveis do que os métodos indiretos, pois não existe a amplificação do sinal por reação enzimática como tipicamente acontece nos métodos indiretos onde se utiliza um anticorpo secundário conjugado com uma enzima.<sup>46</sup>

No entanto a aplicação dos bionanoconjugados na revelação da técnica de *western-blot* irá permitir uma poupança de tempo, pois reduzem-se o número de passos necessários para obter o

resultado (diminui-se um passo de incubação, de lavagem e de posterior adição do substrato e da revelação com o filme) e ainda permite uma redução a nível de custo, deixa de ser necessário a compra de anticorpos secundários, do substrato de quimioluminescência, dos filmes reveladores e de ter uma camara escura e um aparelho revelador dos filmes. Além disso as AuNP também apresentam como vantagem o seu baixo custo quando comparadas com outros tipos de marcadores que se podem aplicar aos anticorpos primários como é o caso de fluoróforos, e da fácil visualização do resultado final a olho nu sem necessidade de equipamentos extra.

Em suma a utilização dos bionanoconjugados para a revelação em *western-blot* é uma técnica promissora que após a otimização de todos os parâmetros envolvidos (limites de deteção, razão anticorpo/AuNP e estabilidade e atividade dos bionanoconjugados) poderá ser utilizada em detrimento de métodos de deteção secundários, como a quimioluminescência, e de outros métodos de deteção direta como a marcação do anticorpo primário com fluoróforos.





## 5 - Conclusões e perspectivas futuras

### 5.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes

Durante este trabalho foram estudadas três diferentes proteínas sendo duas delas a Hsp70 e a HRPII, que poderão ser utilizadas como antígenos em imunoenaios para detecção de malária e a restante a OmpF, cujo papel na absorção de antibióticos através da parede celular está em estudo.

Nesta parte experimental quase todos os objetivos foram cumpridos, isto é conseguiu-se a produção das mesmas e obtê-las com uma pureza necessária para os ensaios onde foram ou serão aplicadas.

Quando à Hsp70 recombinante de *Plasmodium falciparum* o protocolo estabelecido revelou ser eficiente, sendo que a diluição do pré-inóculo não deverá ser superior a 50 vezes e o tempo de incubação após a indução com IPTG não deverá ser inferior a 16 horas.

A produção e purificação da HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum* necessita ainda de diversos ajustes de parâmetros, apesar de com o protocolo atual se conseguir proteína passível de ser utilizada em ensaios. Nomeadamente deve-se otimizar o tempo de incubação após a indução e a concentração de Imidazole a utilizar nos processos de lavagem e de eluição aquando da purificação da proteína.

Passando agora à proteína OmpF recombinante de *E. coli* foi possível obter células capazes de produzir a mesma e conseguiu-se chegar a um processo de produção e purificação no qual se obtém a proteína passível de ser utilizada em ensaios posteriores.

### 5.2 - Aplicações bionanotecnológicas de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* na detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção

Todas as aplicações bionanotecnológicas das proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* produzidas anteriormente implicaram a utilização de bionanoconjugados, AuNP-MUA-2E6 no caso da Hsp70 e AuNP-MUA-2G12 no caso da HRPII.

Quanto à estabilidade dos conjugados AuNP-MUA-2E6 conclui-se que estes são estáveis às condições a que foram testadas. De futuro dever-se-á testar a estabilidade ao longo do tempo quando estes são armazenados à temperatura ambiente ou até a temperaturas mais altas. Estes testes também deverão ser repetidos para os bionanoconjugados AuNP-MUA-2G12 e AuNP-MUA-anti-HRPII.

Quanto aos ensaios de ELISA pretendia-se estudar a influência das nanopartículas de ouro no sinal emitido pela conversão do substrato da peroxidase conjugada com o anticorpo secundário (anti-IgG). Os resultados obtidos indicam que o uso de bionanoconjugados pode ser benéfico neste tipo de ensaios, no entanto existem vários parâmetros que devem ser testados futuramente. Nomeadamente a utilização de bionanoconjugados com uma razão anticorpo/AuNP menor, aumentando o número de partículas em cada ensaio e assim poder-se-á aumentar o sinal emitido e assim diminuir a quantidade de anticorpo necessária e a conjugação do anti-IgG às AuNP em vez do anticorpo 2E6.

Nos ensaios em tiras de nitrocelulose os resultados revelaram ser promissores apesar deste processo se encontrar numa fase inicial de estudo devendo-se de futuro testar novos tempos de incubação e novas razões de anticorpo/AuNP.

Os ensaios de fluorescência exigem um estudo muito mais aprofundado do sistema antes da sua aplicação. É necessário estudar todas as ligações envolvidas de forma a perceber como cada uma ocorre para poder-se prever os fenómenos que irão ocorrer (*quenching* ou *enhancement*) e assim o comportamento a esperar. Também deverá ser revisto processo de conjugação do

antígeno ao fluoróforo de forma a garantir valores de intensidade de fluorescência mais elevados.

A HRP II recombinante durante este trabalho experimental apenas foi utilizada nos ensaios de *western-blot*, nos quais foi possível identificar a proteína em estudo independentemente do método de revelação (quimiluminescência ou utilizando os bionanoconjugados). No entanto independentemente do método, apareceram bandas que não corresponderão à proteína em questão. De futuro dever-se-á tentar descobrir a que proteínas, estas correspondem de forma a prever como estas poderão interferir em ensaios futuros, como ensaios de fluorescência, ELISA entre outros.

## 6 - Bibliografia

1. Amersham Pharmacia Biotech The Recombinant Protein Handbook. at <[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/RelatedContent/Files/1336168762999/litdoc18114275\\_20120505001440.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1336168762999/litdoc18114275_20120505001440.pdf)>
2. Mayer, M. P. & Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 670–84 (2005).
3. World Health Organization World Malaria report 2012. (2012).at <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_full\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf)>
4. Shonhai, A., Boshoff, A. & Blatch, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. *Protein Science* 1803–1818 (2007).doi:10.1110/ps.072918107.affinity
5. Misra, G. & Ramachandran, R. Hsp70-1 from *Plasmodium falciparum*: protein stability, domain analysis and chaperone activity. *Biophysical chemistry* **142**, 55–64 (2009).
6. Baker, J. *et al.* Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria journal* **9**, 129 (2010).
7. Ndonwi, M. *et al.* Inhibition of antithrombin by *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II. *Blood* **117**, 6347–54 (2011).
8. Lee, N. *et al.* Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *Journal of clinical microbiology* **44**, 2773–8 (2006).
9. Laurent, A. *et al.* Performance of HRP-2 based rapid diagnostic test for malaria and its variation with age in an area of intense malaria transmission in southern Tanzania. *Malaria journal* **9**, 294 (2010).
10. Oteo, J., Lázaro, E., De Abajo, F. J., Baquero, F. & Campos, J. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerging infectious diseases* **11**, 546–53 (2005).
11. Arcidiacono, S., Butler, M. M. & Mello, C. M. A rapid selective extraction procedure for the outer membrane protein (OmpF) from *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **25**, 134–7 (2002).
12. Bredin, J., Simonet, V., Iyer, R., Delcour, A. H. & Pagès, J.-M. Colicins, spermine and cephalosporins: a competitive interaction with the OmpF eyelet. *The Biochemical journal* **376**, 245–52 (2003).
13. Mahendran, K. R. *et al.* Molecular basis of enrofloxacin translocation through OmpF, an outer membrane channel of *Escherichia coli*--when binding does not imply translocation. *The journal of physical chemistry. B* **114**, 5170–9 (2010).
14. Mach, T. *et al.* Facilitated permeation of antibiotics across membrane channels--interaction of the quinolone moxifloxacin with the OmpF channel. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 13301–9 (2008).

15. USA.gov Center for Disease Control and Prevention. (2010).at  
<<http://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>>
16. Prudêncio, M., Rodriguez, A. & Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nature reviews. Microbiology* **4**, 849–56 (2006).
17. Doenças em África Malária. (2007).at  
<<http://doencasemafrika.wetpaint.com/page/Malária>>
18. Rosenthal, P. J. How do we best diagnose malaria in Africa? *The American journal of tropical medicine and hygiene* **86**, 192–3 (2012).
19. Chiodini, P. L. *et al.* The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **101**, 331–337 (2007).
20. Franco, R. & Pereira, E. Interactions of Gold Nanoparticles with Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins* (2012).doi:10.1007/978-1-4614-1533-6
21. Baptista, P. V *et al.* *Nanoparticles in molecular diagnostics. Progress in molecular biology and translational science* **104**, 427–88 (Elsevier Inc.: 2011).
22. Wilson, R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chemical Society reviews* **37**, 2028–45 (2008).
23. Gomes, I. Interação de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres. (2009).
24. Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. & Parak, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society reviews* **37**, 1896–908 (2008).
25. Jia, C.-P. *et al.* Nano-ELISA for highly sensitive protein detection. *Biosensors & bioelectronics* **24**, 2836–41 (2009).
26. Ambrosi, A., Airò, F. & Merkoçi, A. Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker. *Analytical chemistry* **82**, 1151–6 (2010).
27. Guirgis, B. S. S. *et al.* Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* **402**, 1019–27 (2012).
28. Parolo, C., De la Escosura-Muñiz, A. & Merkoçi, A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors & bioelectronics* **40**, 412–6 (2013).
29. Zhao, Y. *et al.* Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 12138–42 (2008).
30. Cavadas, M. Gold nanoparticle to antibody conjugates for diagnosis applications : molecular interactions and immunoassay development. (2011).
31. Bejon, P. *et al.* Thick blood film examination for Plasmodium falciparum malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malaria journal* **5**, 104 (2006).

32. Centers for Disease Control and Prevention Laboratory identification of Parasites of Public Health Concern. (2009).at  
<[http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm)>
33. Moody, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 66–78 (2002).
34. Standart Diagnostics Inc Malaria ELISA Kit. (2007).at  
<[http://www.standardia.com/html\\_e/mn03/mn03\\_01\\_00.asp?intId=112](http://www.standardia.com/html_e/mn03/mn03_01_00.asp?intId=112)>
35. Doderer, C. *et al.* A new ELISA kit which uses a combination of Plasmodium falciparum extract and recombinant Plasmodium vivax antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malaria journal* **6**, 19 (2007).
36. Houzé, S., Boly, M. D., Le Bras, J., Deloron, P. & Faucher, J.-F. PfHRP2 and PfLDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Malaria journal* **8**, 211 (2009).
37. The global found to fight AIDS, T. and M. LIST OF RAPID DIAGNOSTIC TEST ( RDT ) KITS FOR MALARIA. 0–3 (2013).
38. Herman, B. *et al.* Basic Concepts in Fluorescence. (2012).at  
<<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>>
39. Mayilo, S. *et al.* Competitive homogeneous digoxigenin immunoassay based on fluorescence quenching by gold nanoparticles. *Analytica chimica acta* **646**, 119–22 (2009).
40. Hu, D. *et al.* Gold(III) enhanced chemiluminescence immunoassay for detection of antibody against ApxIV of Actinobacillus pleuropneumoniae. *The Analyst* **133**, 768–73 (2008).
41. Kühn, S., Håkanson, U., Rogobete, L. & Sandoghdar, V. Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Using a Gold Nanoparticle as an Optical Nanoantenna. *Physical Review Letters* **97**, 017402 (2006).
42. Anger, P., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Physical Review Letters* **96**, 113002 (2006).
43. Wang, X. *et al.* Gold nanoparticle enhanced fluorescence anisotropy for the assay of single nucleotide polymorphisms (SNPs) based on toehold-mediated strand-displacement reaction. *Biosensors & bioelectronics* **41**, 569–75 (2013).
44. Butler, J. E. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of immunoassay* **21**, 165–209 (2012).
45. PATH RDT Technologies. (2008).at <<http://www.rapid-diagnostics.org/technologies.htm>>

46. Thermo Fisher Scientific Overview of Western Blotting. (2013).at  
<<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=8259A7B6-7DA6-41CF-9D55-AA6C14F31193#introduction>>
47. Kimling, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The journal of physical chemistry. B* **110**, 15700–7 (2006).
48. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical chemistry* **79**, 4215–21 (2007).
49. Sigma-aldrich Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. 1–6 (2011).at  
<<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/bca1bul.Par.0001.File.tmp/bca1bul.pdf>>
50. Matambo, T. S., Odunuga, O. O., Boshoff, A. & Blatch, G. L. Overproduction, purification, and characterization of the Plasmodium falciparum heat shock protein 70. *Protein Expression and Purification* **33**, 214–222 (2004).
51. Roche High Pure Plasmid Isolation Kit. (2011).at  
<[https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11754777001\\_en\\_09.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11754777001_en_09.pdf)>
52. Tsuji, M., Mattei, D., Nussenzweig, R. S., Eichinger, D. & Zavala, F. Demonstration of heat-shock protein 70 in the sporozoite stage of malaria parasites. *Parasitology research* **80**, 16–21 (1994).
53. Healthcare, G. E. & Sciences, L. Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow. 1–12at  
<[http://www.xingyibio.com/pdf/products/UG\\_Protein G Sepharose 4 Fast Flow.pdf](http://www.xingyibio.com/pdf/products/UG_Protein G Sepharose 4 Fast Flow.pdf)>
54. GE Healthcare Protein G HP SpinTrap / Ab SpinTrap. (2007).at  
<[http://www.gelifesciences.co.jp/tech\\_support/manual/pdf/28906772.pdf](http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/28906772.pdf)>
55. Guirgis, B. S. S. Development of Prototype Gold Nanoparticle-Based Immunoassays for the detection of Plasmodium falciparum Hsp70. (2010).
56. QIAGEN Ni-NTA Agarose. (2013).at  
<<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/Protein-Sample-Technologies/Purification-Kits-and-Resins/Ni-NTA-Agarose#technicalspecification>>
57. Prilipov, A. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from E. coli. *FEMS Microbiology Letters* **163**, 65–72 (1998).
58. Oxford Gene Technology Understanding and measuring variations in DNA sample quality. (2011).at  
<[http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality)>
59. Rodrigues, A. Produção de membranas (porinas) essenciais na translocação de antibióticos em bactérias gram (-). (2007).

60. Muthirulan, P. & Rajendran, N. Poly(o-phenylenediamine) coatings on mild steel: Electrosynthesis, characterization and its corrosion protection ability in acid medium. *Surface and Coatings Technology* **206**, 2072–2078 (2012).
61. Daniel, M. & Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews* **104**, 293–346 (2004).
62. Dai, X. *et al.* Fluorescence intensity and lifetime imaging of free and micellar-encapsulated doxorubicin in living cells. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **4**, 49–56 (2008).
63. Hall, L. M., Gerowska, M. & Brown, T. A highly fluorescent DNA toolkit: synthesis and properties of oligonucleotides containing new Cy3, Cy5 and Cy3B monomers. *Nucleic acids research* **40**, e108 (2012).
64. López, R. *et al.* Plasmodium falciparum: red blood cell binding studies of peptides derived from histidine-rich KAHRP-I, HRP-II and HRP-III proteins. *Acta tropica* **75**, 349–59 (2000).





## 7 - Anexos

### 7.1 - Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes

#### 7.1.1 - Meios de Cultura utilizados nas produções de proteínas recombinantes

##### 7.1.1.1 - Meio SOC

- 2% p/v Triptona
- 0,5% p/v Extrato de levedura
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> ou 20 mM MgSO<sub>4</sub>
- 20 mM Glucose

##### 7.1.1.2 - Meio LBagar

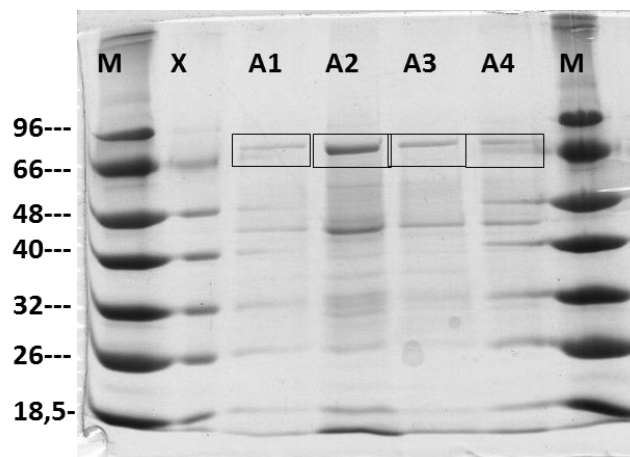
- 3,5% p/v LBagar

##### 7.1.1.3 - Meio LB

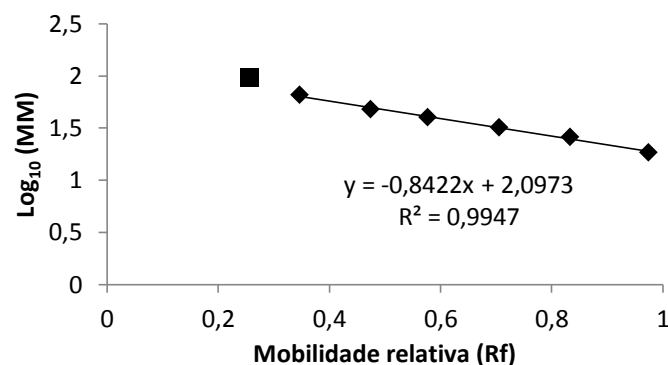
- 1% p/v Triptona
- 1% p/v Extrato de levedura
- 0,5% NaCl

#### 7.1.2 - Hsp70 recombinante de Plasmodium falciparum

##### 7.1.2.1 - 1ª Produção

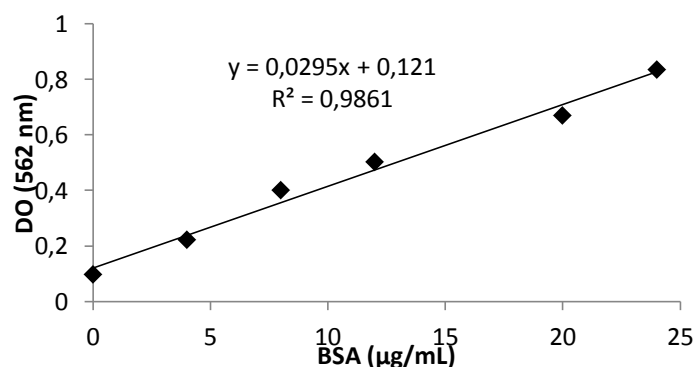


**Figura 7.1** Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:2). M – Padrão de pesos moleculares (kDa); A1 a A4 – eluído com tampão de eluição.



**Figura 7.2** Retas de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.1 e o Log10 da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.2 e do valor da migração da banda assinalada na Figura 7.1 foi possível calcular o valor da massa molecular da mesma, aproximadamente 71 kDa.

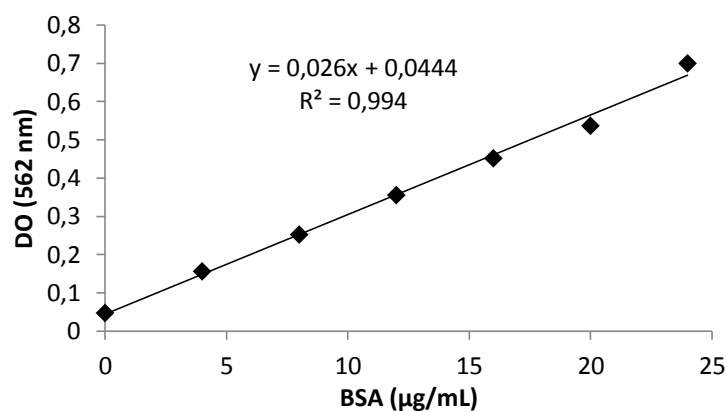


**Figura 7.3** Retas de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (1ª Produção) antes de concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.1 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, das frações da Figura 7.1, a partir da equação da reta da Figura 7.3.

**Tabela 7.1** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.3.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
A1	0,2665	1:50	0,247
	0,3833	1:34	0,296
A2	0,3294	1:50	0,353
	0,3893	1:34	0,303
A3	0,5109	1:100	1,322
	0,8463	1:50	1,229
A4	0,3271	1:50	0,349
	0,4145	1:34	0,332



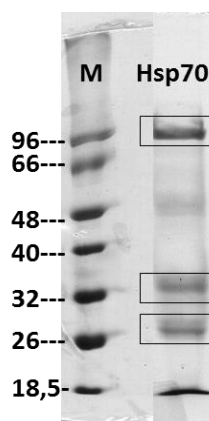
**Figura 7.4** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (1ª Produção) após concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.2 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína Hsp70 recombinante obtida no final do primeiro processo de produção e purificação.

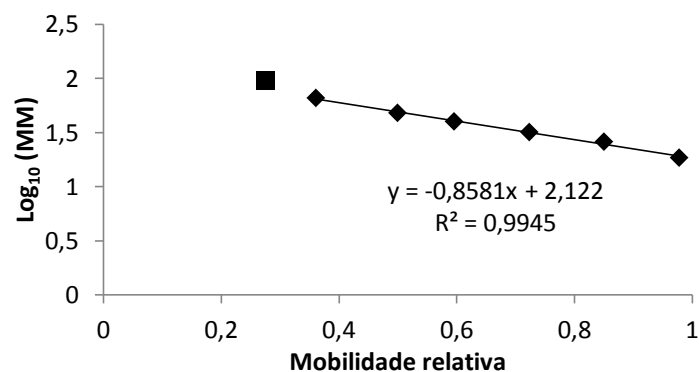
**Tabela 7.2** Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.4.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,3517	1:100	1,182
2	0,3331	1:100	1,110

#### 7.1.2.2 - 2ª Produção

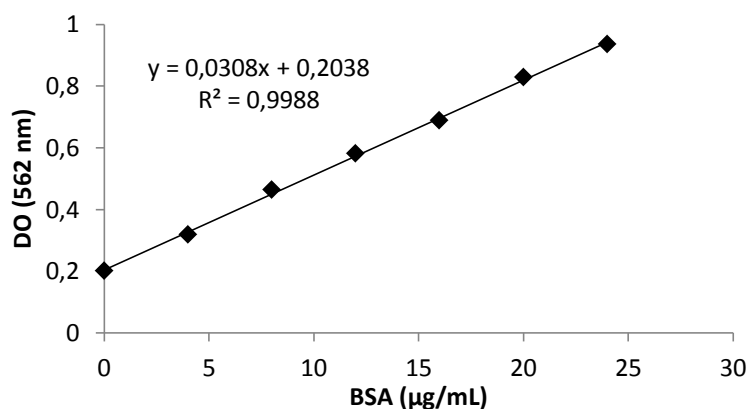


**Figura 7.5** Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); Hsp70 – proteína final obtida.



**Figura 7.6** Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.5 e o Log10 da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.6 e do valor da migração das 3 bandas assinaladas na Figura 7.5, foi possível calcular o valor da massa molecular das mesmas, obtendo-se os valores de 85, 34 e 29 kDa.



**Figura 7.7** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (2ª Produção) após concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.3 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína Hsp70 recombinante obtida no final do segundo processo de produção e purificação.

**Tabela 7.3** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.7.

Amostra	DO (nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,496	1:50	0,474
2	0,519	1:50	0,512

### 7.1.2.3 - 3ª Produção

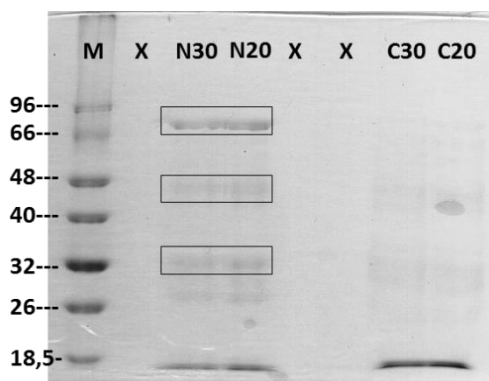


Figura 7.8 Gel de SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 3:1 ou 2:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); N30 – Hsp70 recombinante antes de concentração e troca de tampão, diluída 3:1; N20 – Hsp70 recombinante antes de concentração e troca de tampão, diluída 2:1; C30 – Hsp70 recombinante após concentração e troca de tampão, diluída 3:1; C20 – Hsp70 recombinante após concentração e troca de tampão, diluída 2:1.

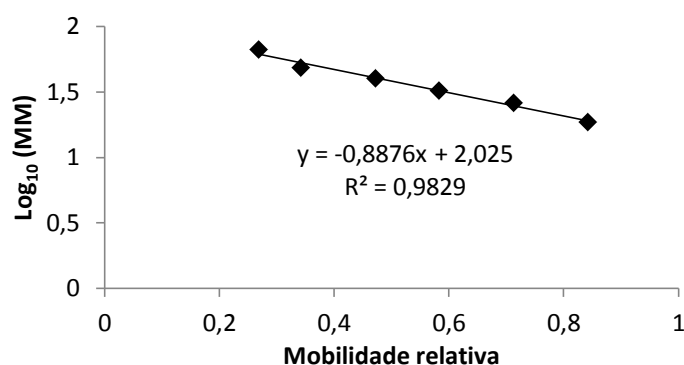


Figura 7.9 Retas de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.8 e o Log<sub>10</sub> da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.9 e do valor da migração das 6 bandas assinaladas (que migraram a mesma distancia duas a duas) na Figura 7.8, foi possível calcular o valor da massa molecular das mesmas, obtendo-se os valores de 75, 51 e 33 kDa.

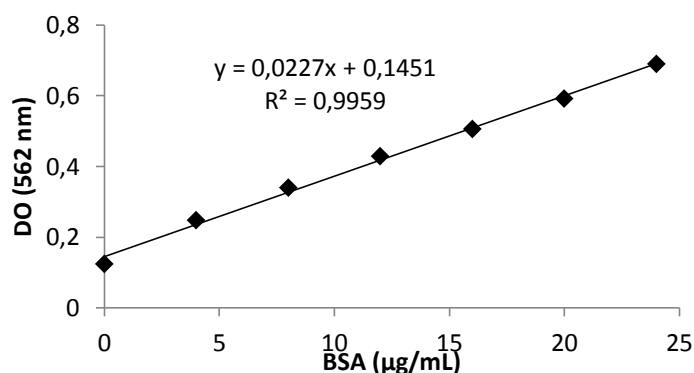


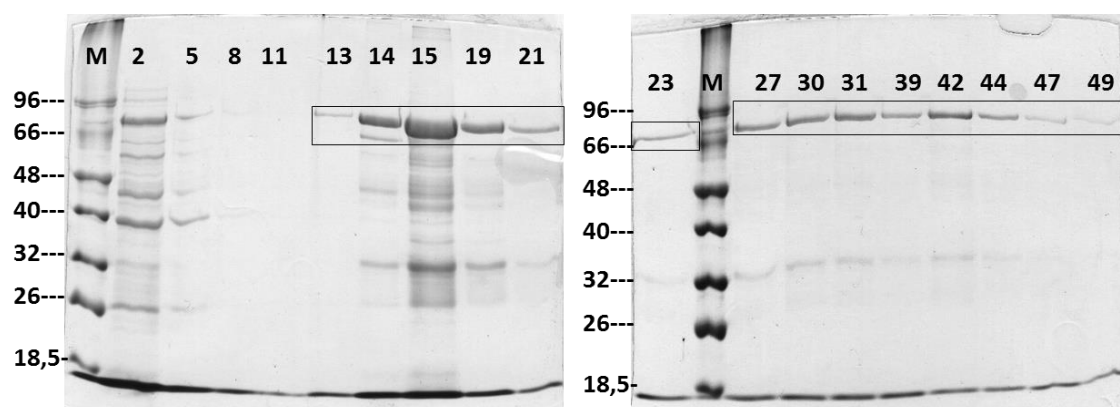
Figura 7.10 Retas de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (3ª Produção) antes e após concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.4 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína Hsp70 recombinante obtida durante o terceiro processo de produção e purificação.

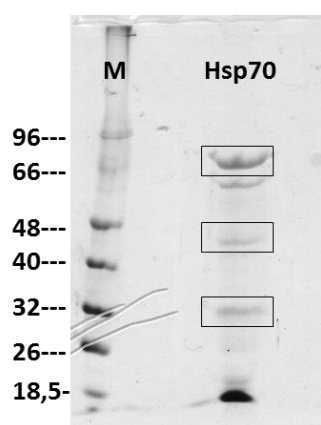
**Tabela 7.4 Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.10.**

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
Proteína antes de concentração e troca de tampão	0,207	1:100	0,273
	0,217	1:100	0,317
Proteína após concentração e troca de tampão	0,202	1:100	0,251
	0,199	1:100	0,237

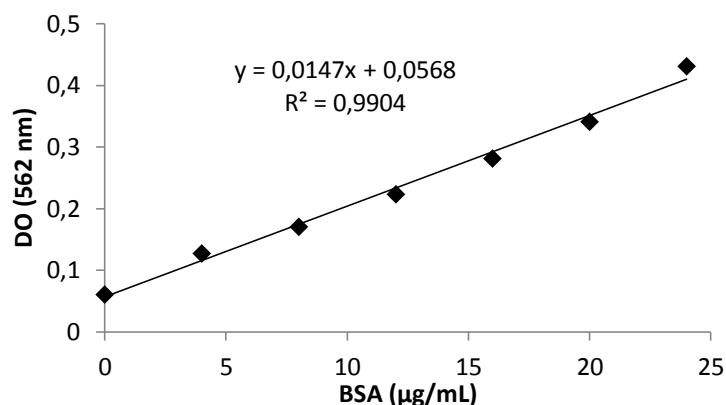
#### 7.1.2.4 - 4ª Produção



**Figura 7.11** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 2 a 11 – frações eluídas com tampão de lavagem; 13 a 14 – frações eluídas com tampão de eluição.



**Figura 7.12** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); Hsp70 – proteína final obtida após concentração e troca de tampão.



**Figura 7.13** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de Hsp70 recombinante (4ª Produção) após concentração e troca de tampão.

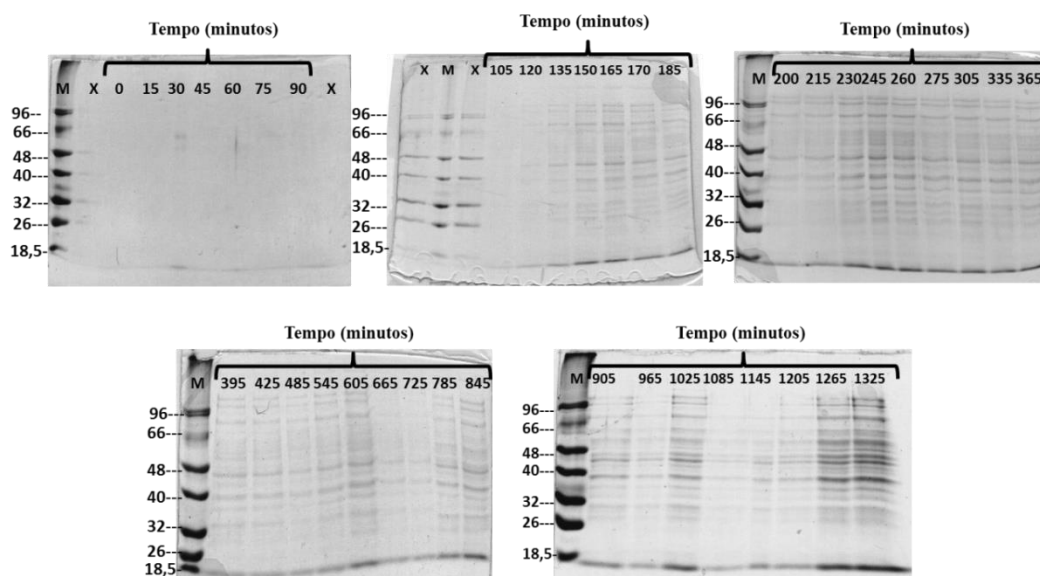
Na Tabela 7.5 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína Hsp70 recombinante obtida no final do quarto processo de produção e purificação.

**Tabela 7.5** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.13.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,3581	1:34	0,683
2	0,3267	1:34	0,612

### 7.1.3 - HRPII recombinante de *Plasmodium falciparum*

#### 7.1.3.1 - Curva de crescimento



**Figura 7.14** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); Amostras recolhidas ao longo de todo o crescimento de *E.coli* BL21 para produção de HRPII recombinante utilizando 400 µM de IPTG.

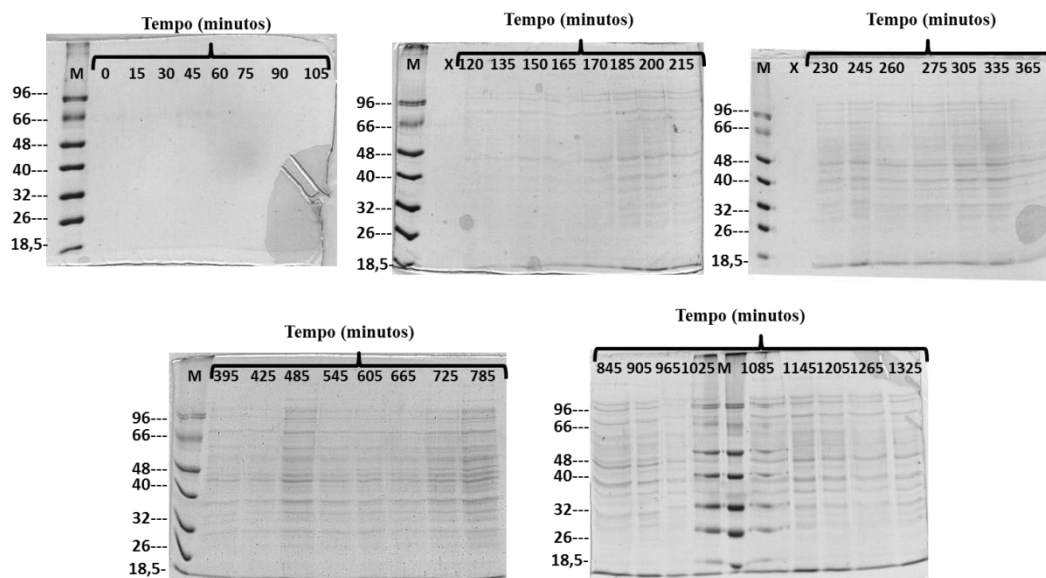


Figura 7.15 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h15, amostras diluídas 2:1). M – marcador de peso molecular (kDa); Amostras recolhidas ao longo de todo o crescimento de *E.coli* BL21 para produção de HRPII recombinante utilizando 50  $\mu$ M de IPTG.

### 7.1.3.2 - 1ª Produção

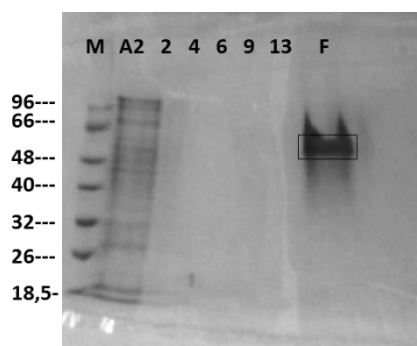


Figura 7.16 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h10, amostras diluídas 1:2). M – marcador de pesos moleculares (kDa); A2 – amostra antes da purificação; 2 a 6 – eluído com tampão de lavagens; 9 a 13 – eluído com tampão de eluição; F – proteína final.

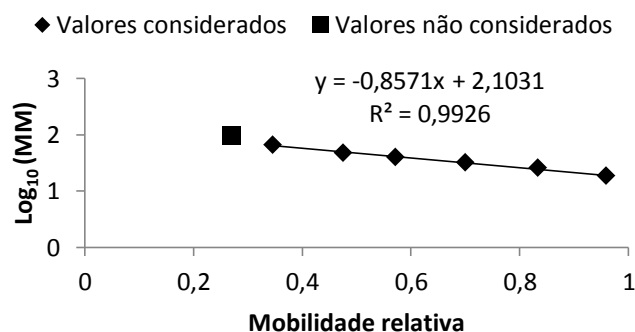
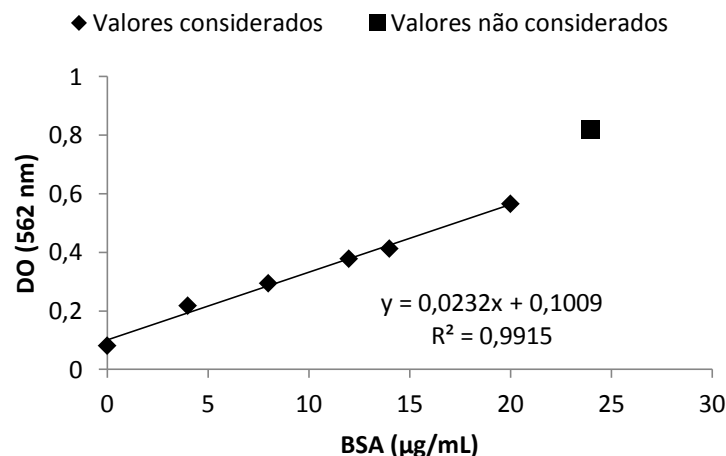


Figura 7.17 Retas de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.16 e o  $\text{Log}_{10}$  da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.17 e do valor da migração da banda assinalada na Figura 7.16, foi possível calcular o valor da massa molecular da mesma, obtendo-se o valor de 60 kDa.



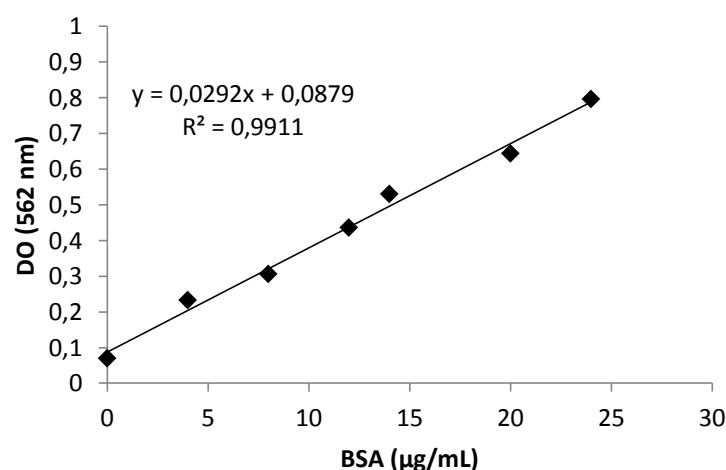


**Figura 7.18** Retas de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (1ª Produção) antes de concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.6 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no primeiro processo de produção e purificação, antes do processo de concentração e troca de tampão de eluição para tampão TBS.

**Tabela 7.6** Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.18.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,2209	1:50	0,259
2	0,2195	1:50	0,256



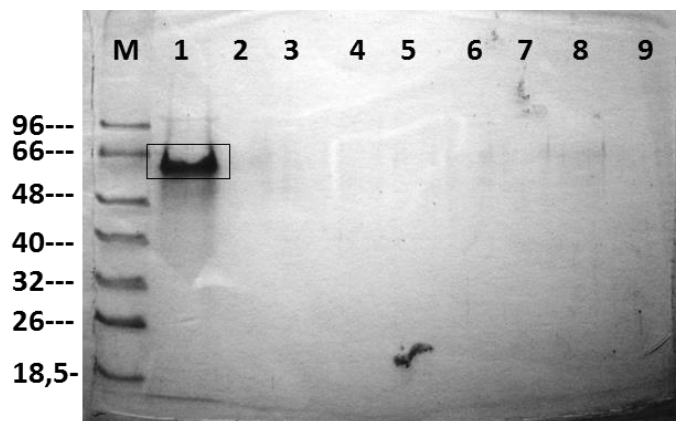
**Figura 7.19** Retas de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (1ª Produção) após concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.7 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no primeiro processo de produção e purificação, após o processo de concentração e troca de tampão de eluição para tampão TBS.

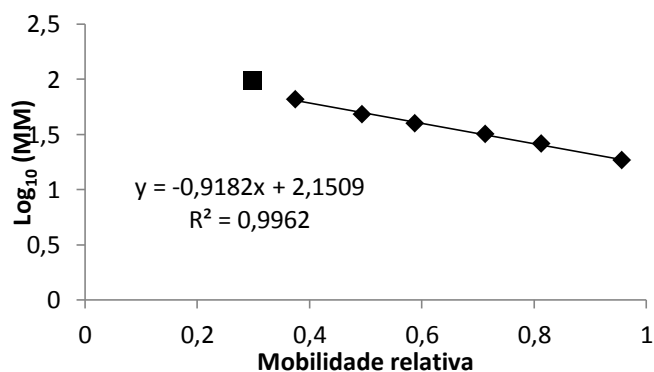
**Tabela 7.7 Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.19.**

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,1512	1:34	0,072
2	0,1473	1:34	0,068

### 7.1.3.3 - 2ª Produção

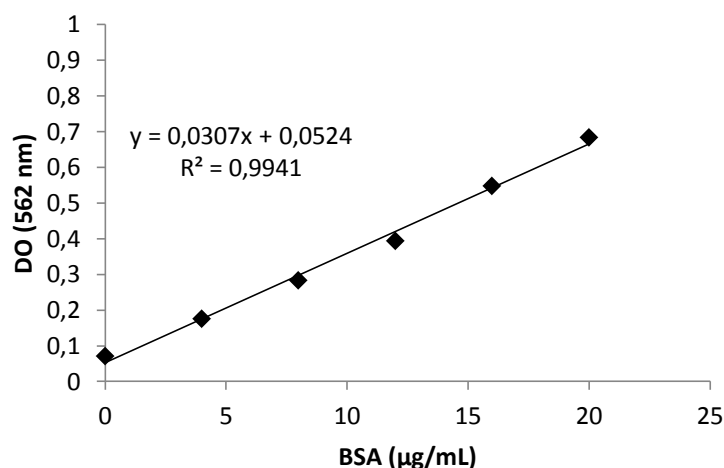


**Figura 7.20 Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h, amostras diluídas 1:3). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 1 a 9 – Frações eluídas com tampão de eluição.**



**Figura 7.21 Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 7.20e o Log<sub>10</sub> da massa molecular das proteínas.**

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.21 e do valor da migração da banda assinalada na Figura 7.20, foi possível calcular o valor da massa molecular da fração 1, obtendo-se o valor de 58 kDa.



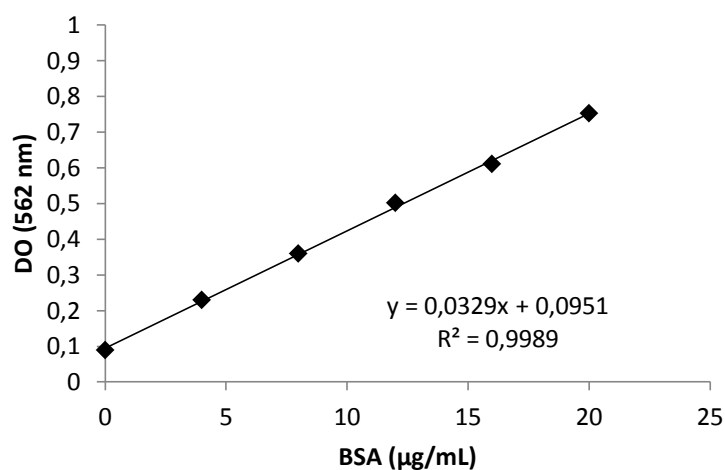
**Figura 7.22** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) antes da concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.8 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no segundo processo de produção e purificação, para as diversas frações obtidas após a adição do tampão de eluição.

**Tabela 7.8** Valores de concentração obtidos de acordo com Figura 7.22

Frações eluídas com tampão de eluição	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,2183	1:100	0,540
	0,2000	1:100	0,481
2	0,1392	1:100	0,283
	0,1436	1:100	0,297
3	0,1354	1:100	0,270
	0,1449	1:100	0,301
4	0,1673	1:100	0,374
	0,159	1:100	0,347
5	0,1491	1:100	0,315
	0,1517	1:100	0,323
6	0,1672	1:100	0,374
	0,1614	1:100	0,355
7	0,1563	1:100	0,338
	0,1746	1:100	0,398

8	0,1622	1:100	0,358
	0,1650	1:100	0,367
9	0,1527	1:100	0,327
	0,1407	1:100	0,288

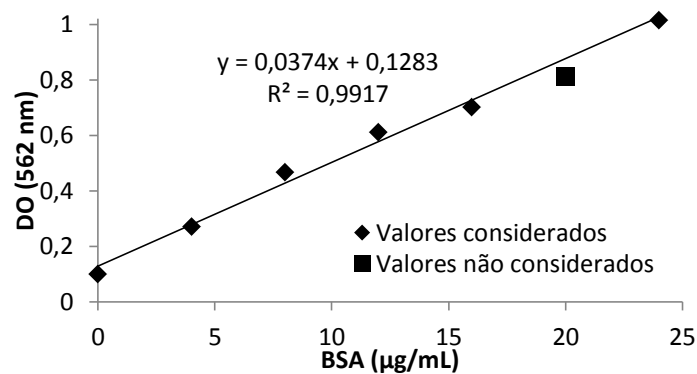


**Figura 7.23** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) após concentração e troca de tampão.

Na Tabela 7.9 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no final do segundo processo de produção e purificação.

**Tabela 7.9** Valores de concentração obtidos de acordo com Figura 7.23.

Stock	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,2028	1:100	0,327
	0,2439	1:100	0,452
2	0,1920	1:100	0,295
	0,2357	1:100	0,427



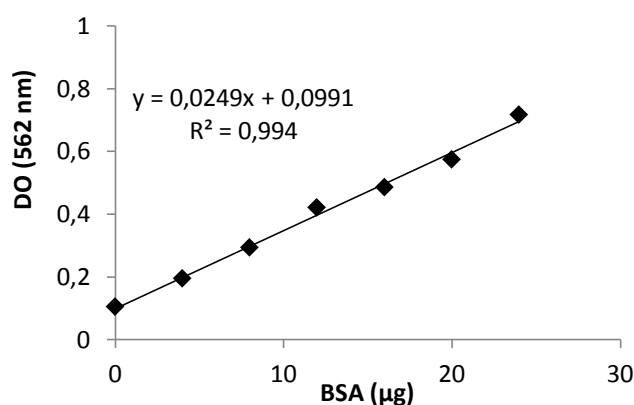
**Figura 7.24** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante (2ª Produção) após 2 semanas.

Na Tabela 7.10 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no segundo processo de produção e purificação, após duas semanas da final do mesmo.

**Tabela 7.10** Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.24.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,1513	1:10	0,006
	0,1490	1:10	0,006
2	0,1460	1:50	0,024
	0,1365	1:50	0,011

#### 7.1.3.4 - 4ª Produção



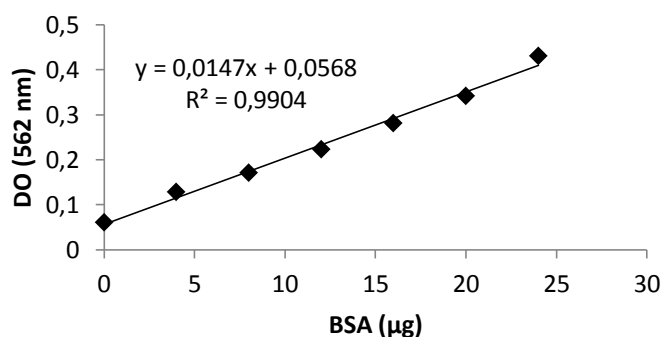
**Figura 7.25** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante, frações referente à 4ª produção.

Na Tabela 7.11 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, das várias frações obtidas da proteína HRPII recombinante durante o quarto processo de produção e purificação.

**Tabela 7.11** Valores de concentração obtidos segundo Figura 7.25.

	DO (562 nm)	Diluição da amostra	Concentração (mg/mL)
<b>Proteína antes da concentração</b>	0,1879	1:25	0,089
	0,1876	1:25	0,089
<b>Proteína após concentração</b>	0,3679	1:25	0,270
	0,3877	1:25	0,290
<b>Eluído processo de concentração</b>	0,1326	1:25	0,034
	0,1384	1:25	0,039
<b>Eluído processo de lavagem</b>	0,1595	1:25	0,062
	0,1612	1:25	0,061

#### 7.1.3.5 - 5ª Produção



**Figura 7.26** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de HRPII recombinante obtida na 5ª produção.

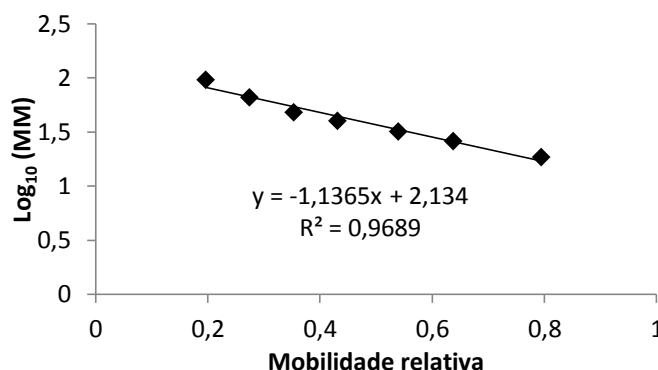
Na Tabela 7.12 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína HRPII recombinante obtida no quinto processo de produção e purificação.

**Tabela 7.12** Valores de concentração obtidos através da Figura 7.26.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,1008	1:100	0,299
2	0,0958	1:100	0,265

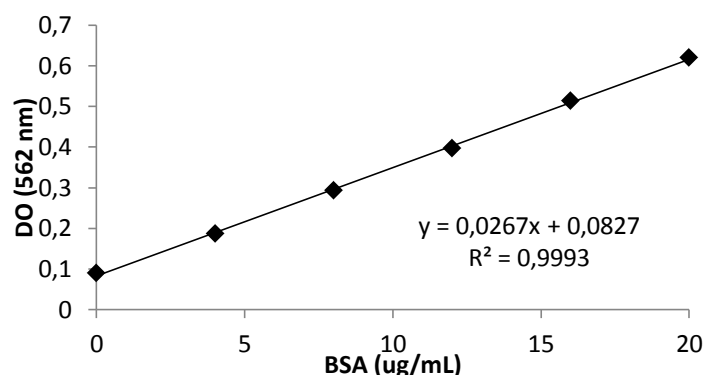
## 7.1.4 - OmpF recombinante de *E. coli*

### 7.1.4.1 - 1ª Produção



**Figura 7.27** Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.10 e o  $\text{Log}_{10}$  da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.27 e do valor da migração das duas bandas assinaladas na Figura 4.10, foi possível calcular o valor da massa molecular das duas sendo 46 e 34 kDa respectivamente.



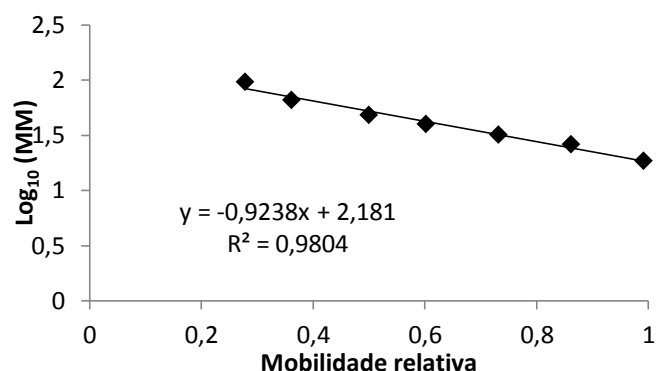
**Figura 7.28** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 1ª produção.

Na Tabela 7.13 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína OmpF recombinante final obtida durante o primeiro processo de produção e purificação.

**Tabela 7.13** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.28.

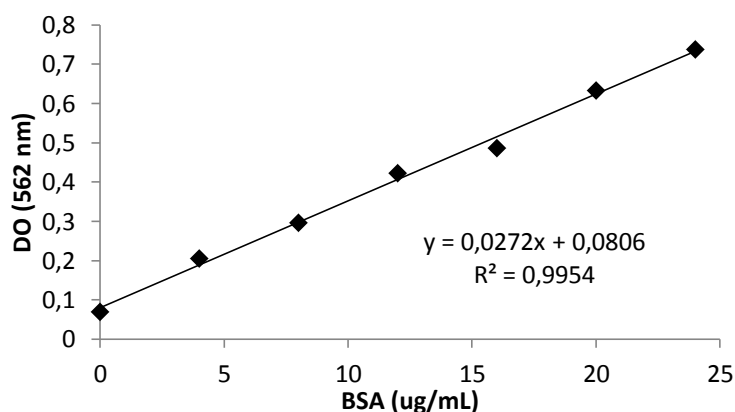
Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,5566	1:200	3,86
2	0,4854	1:200	3,33

#### 7.1.4.2 - 2ª Produção



**Figura 7.29** Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.11 e o  $\text{Log}_{10}$  da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.29 e do valor da migração das quatro bandas assinaladas na Figura 4.11, foi possível calcular o valor da massa molecular das mesmas obtendo-se os valores de 89, 59, 42 e 31 kDa.



**Figura 7.30** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 2ª produção.

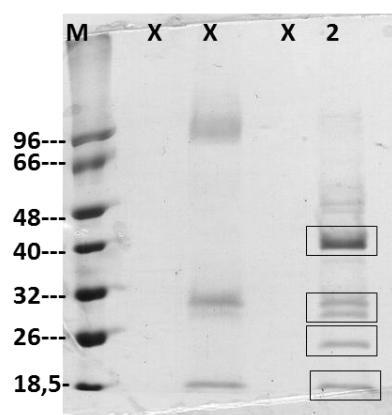
Na Tabela 7.14 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína OmpF recombinante final obtida durante o segundo processo de produção e purificação.

**Tabela 7.14** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.30.

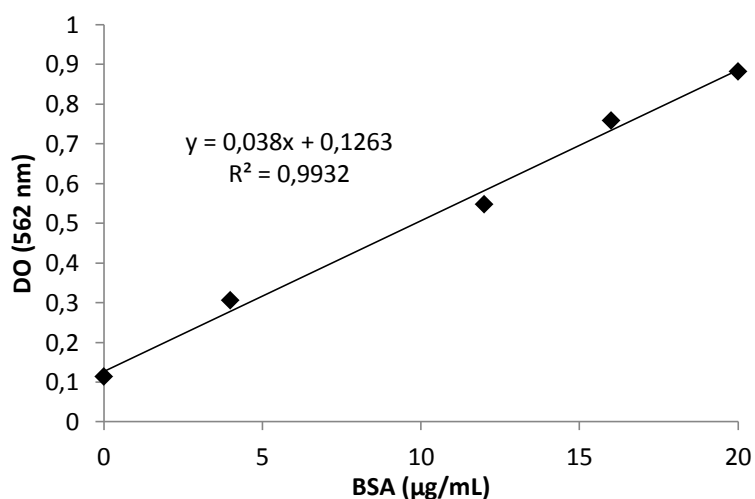
Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,6273	1:100	2,01
2	0,6200	1:100	1,98



### 7.1.4.3 - 3ª Produção



**Figura 7.31** Gel SDS-PAGE (10%, 150 V, 1h30, amostras diluídas 1:1). M – marcador de pesos moleculares (kDa); 2 – OmpF final obtida.



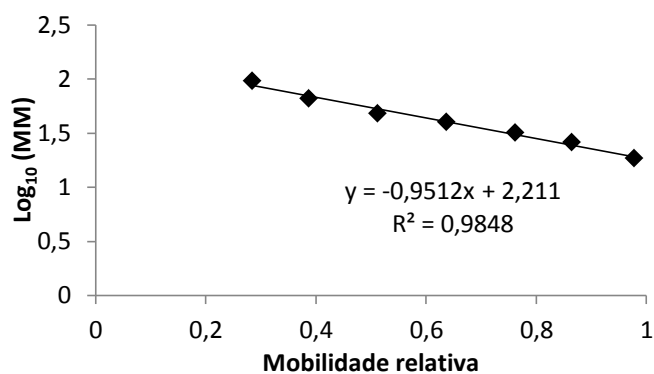
**Figura 7.32** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 3ª produção.

Na Tabela 7.15 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína OmpF recombinante final obtida durante o terceiro processo de produção e purificação.

**Tabela 7.15** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.32.

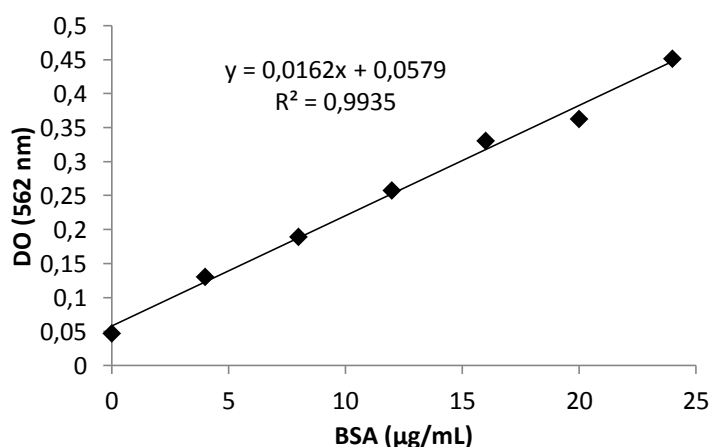
Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,371	1:100	0,644
2	0,370	1:100	0,641

#### 7.1.4.4 - 4ª Produção



**Figura 7.33** Reta de calibração construída a partir dos valores de mobilidade relativa das proteínas do padrão de pesos moleculares Figura 4.12 e o  $\text{Log}_{10}$  da massa molecular das proteínas.

A partir da equação da reta obtida na Figura 7.33 e do valor da migração das duas bandas assinaladas na Figura 4.12, foi possível calcular o valor da massa molecular das mesmas obtendo-se o valor de aproximadamente 44 kDa para ambas.



**Figura 7.34** Reta de calibração pelo método de BCA para quantificação de OmpF recombinante obtida na 4ª produção.

Na Tabela 7.16 pode-se observar os valores de concentração calculados, assim como os parâmetros utilizados para o seu cálculo, da proteína OmpF recombinante final obtida durante o quarto processo de produção e purificação.

**Tabela 7.16** Valores de concentração obtidos a partir da Figura 7.34.

Amostra	DO (562 nm)	Diluição	Concentração (mg/mL)
1	0,3437	1:100	1,76
2	0,3578	1:100	1,85

## 7.2 - Aplicações de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum* à detecção de malária recorrendo a métodos de nanoimunodeteção

### 7.2.1 - Avaliação da estabilidade dos bionanoconjugados AuNP-MUA-2E6 (BSA) ao longo do tempo e com a variação do pH e da força iónica do meio

#### 7.2.1.1 - Variação da força iónica

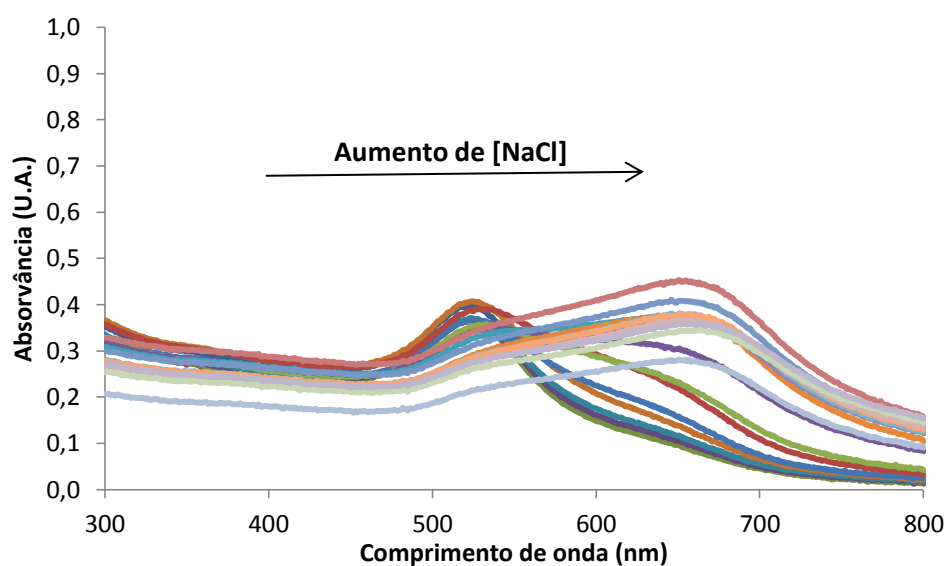


Figura 7.35 Representação dos espectros de absorvância de AuNP com a variação da força iónica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M.

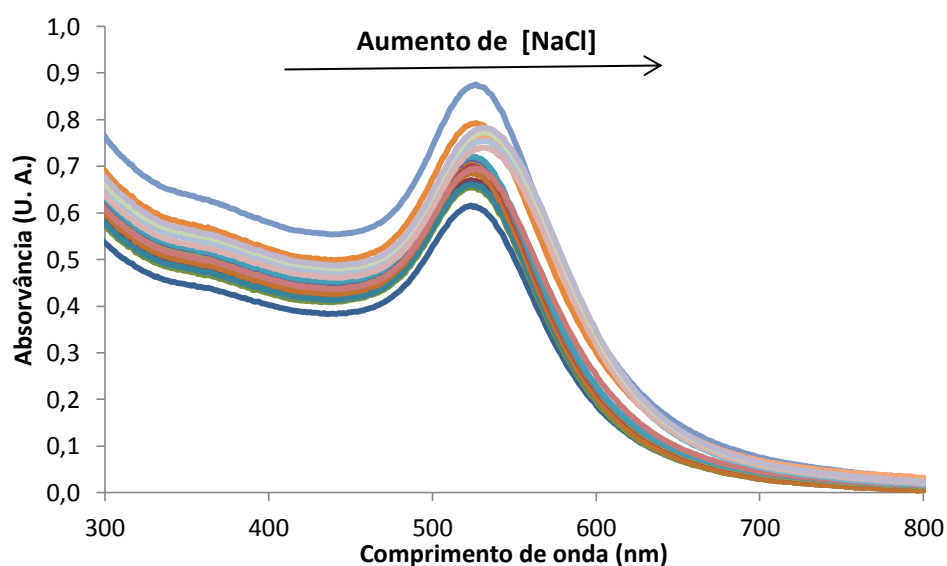
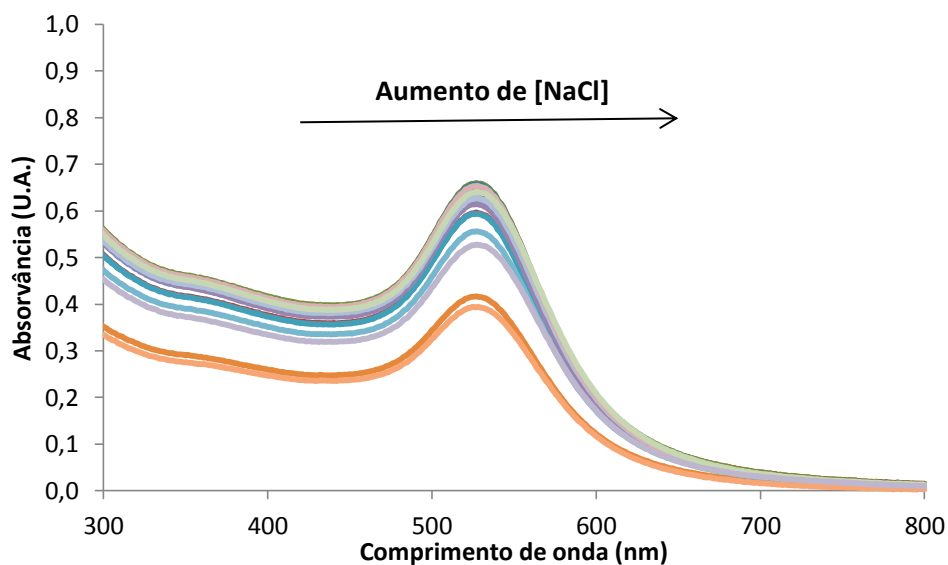
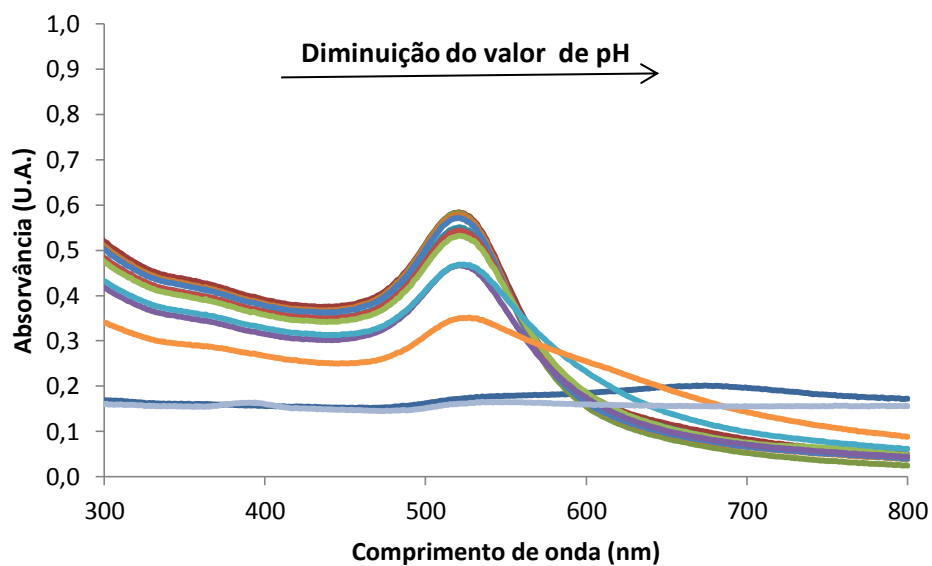


Figura 7.36 Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA com a variação da força iónica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M.

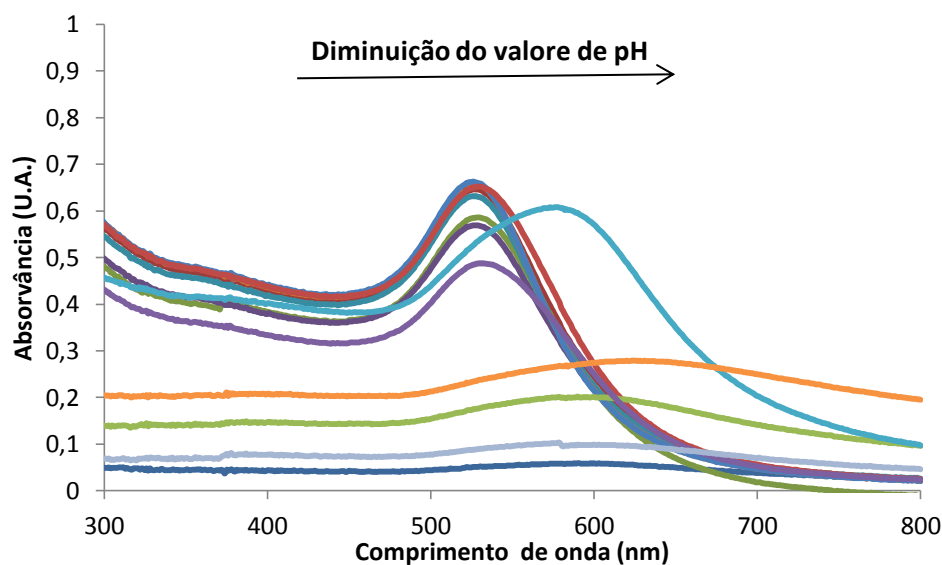


**Figura 7.37** Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA-2E6 com a variação da força iônica, utilizando uma gama de concentração de NaCl entre 0 e 2,5 M.

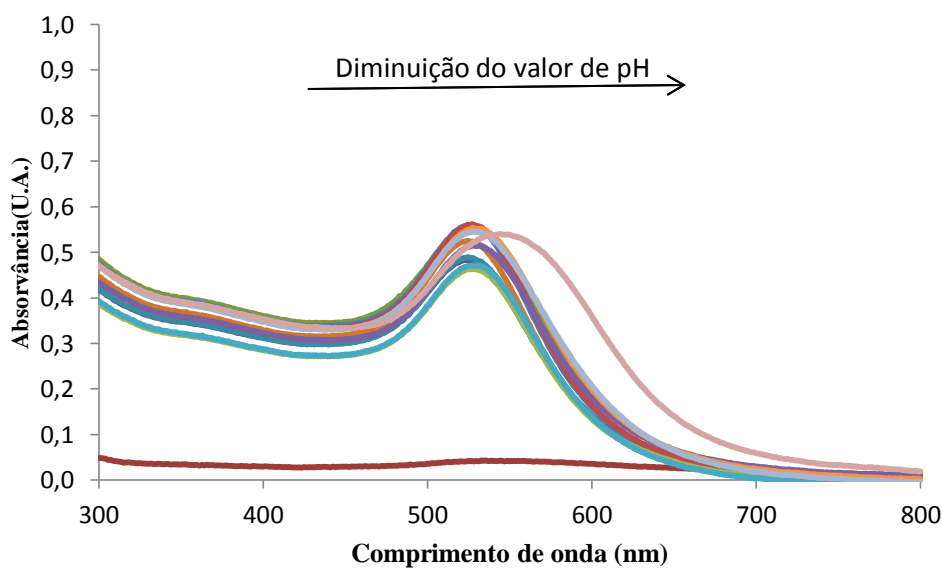
#### 7.2.1.2 - Variação do pH



**Figura 7.38** Representação dos espectros de absorvância de AuNP com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13.



**Figura 7.39** Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13.



**Figura 7.40** Representação dos espectros de absorvância de AuNP-MUA-2E6 com a variação do pH, utilizando uma gama de valores de pH entre 1 e 13.

#### 7.2.1.3 - Dynamic Light scattering (DLS)<sup>23</sup>

A técnica de DLS é uma técnica através da qual se pode determinar o diâmetro hidrodinâmico de partículas com dimensões na ordem dos nanómetros e pode ser aplicada para a determinação de tamanhos de proteínas, nanopartículas, polímeros, entre outros.

As partículas possuem um movimento aleatório designado de movimento Browniano que pode ser medido quando estas são iluminadas por um laser. Este movimento depende do tamanho das partículas sendo que partículas mais pequenas movem-se de uma forma mais rápida enquanto partículas maiores movem-se mais devagar.

O tamanho das partículas e o movimento Browniano das partículas pode ser relacionado através da equação de Stokes-Einstein.

**Equação 3**  $d(H)$  descreve o diâmetro hidrodinâmico,  $D$  descreve o coeficiente de difusão translacional,  $k$  é a constante de Boltzman,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

O diâmetro hidrodinâmico ( $d(H)$ ) obtido nesta técnica corresponde ao diâmetro da partícula com o mesmo coeficiente de difusão translacional da partícula, que está dependente do tamanho do núcleo da partícula, da estrutura da superfície, concentração e tipo de íons do meio, o que afeta a velocidade de difusão das partículas.